N° D'ORDRE
231

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Simonne JEREBZOFF - QUINTIN
Attachée de Recherche au C. N. R. S.

1er SUJET — INTERACTIONS DE CROISSANCE D'ORGANISMES INÉGALEMENT RÉSISTANTS A L'ACIDE β - INDOLYL - ACÉTIQUE EXOGÈNE.

2e SUJET — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues en Octobre 1964, devant la Commission d'examen :

MM. A. BRUNEL, *Président*

H. GAUSSEN
P. CHOUARD
J.L. TROCHAIN
F. NYSTERAKIS
} *Examinateurs*

IMPRIMERIE DU SUD
24, RUE DE NEGRENEYS
TOULOUSE

1964

INTERACTIONS DE CROISSANCE D'ORGANISMES INÉGALEMENT RÉSISTANTS A L'ACIDE β-INDOLYL-ACÉTIQUE EXOGÈNE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

N° D'ORDRE
231

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Simonne JEREBZOFF - QUINTIN
Attachée de Recherche au C. N. R. S.

1er SUJET — INTERACTIONS DE CROISSANCE D'ORGANISMES INÉGALEMENT RÉSISTANTS A L'ACIDE β - INDOLYL - ACÉTIQUE EXOGÈNE.

2e SUJET — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues en Octobre 1964, devant la Commission d'examen :

MM. A. BRUNEL, *Président*

H. GAUSSEN
P. CHOUARD
J.L. TROCHAIN
F. NYSTERAKIS
} *Examinateurs*

IMPRIMERIE DU SUD
24, RUE DE NEGRENEYS
TOULOUSE

1964

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ DES SCIENCES

TABLEAU DU PERSONNEL

ADMINISTRATION

MM.	**Durand**	Doyen
	Trochain	Assesseur.

HONORARIAT

MM.	**Camichel**	Professeur honoraire, Membre de l'Institut.
	Capdecomme	Doyen honoraire, Recteur honoraire.
	Chalaud	Professeur honoraire.
	Deltheil	Recteur honoraire, Doyen honoraire, Professeur honoraire.
	Dupouy	Doyen honoraire, Membre de l'Institut, Directeur général honoraire du C.N.R.S.
	Fouché	Professeur honoraire.
	Gaussen	Professeur honoraire, correspondant de l'Institut.
	Jacques	Professeur honoraire.
	Mignonac	Professeur honoraire.
	Morquer	Professeur honoraire.

PROFESSEURS

MM.	**Vandel**	Zoologie, Membre de l'Institut.
	Cathala	Chimie Physique et Electrochimie.
	Escande	Mécanique des Fluides, Membre de l'Institut.
	Dupouy	Physique, Membre de l'Institut.
	Castéras	Géologie, Correspondant de l'Institut.
	Bedos	Chimie.
	Capdecomme	Minéralogie.
	Dupin	Radioélectricité.
	Teissié-Solier	Electrotechnique.
	Nouvel	Biologie générale.
	Gallais	Chimie.
	Durand	Physique.
	Fert	Physique.
	Diehl	Agronomie.
	Combes	Calcul différentiel et intégral.
	Lesbre	Chimie organique.
	Blaizot	Physiologie.
	Brunel	Physiologie végétale.
	Huron	Mathématiques appliquées.
	Margulis	Pédologie.
	Triche	Chimie analytique et Spectrographie.
	Pasqualini	Mathématiques.
	Ledoux	Zoologie appliquée.
	Rivals	Agriculture.
	Perrier	Physique.
	Mathis	Chimie.
	Orliac	Géochimie et Minéralogie.
	Lafourcade	Physique.
	Angelier	Zoologie.
Mlle	**de Ferre**	Botanique.
MM.	**Farran**	Minéralogie et Géotechnique.
	Laudet	Physique théorique et Calcul numérique.
	Serfaty	Biologie animale.
	Nougaro	Hydraulique générale et appliquée.
	Lagasse	Electrotechnique.
	Gardy	Génie chimique.
	Blanc	Physique nucléaire.
	Birebent	Electronique appliquée.
	Voigt	Chimie minérale.
	Leredde	Botanique.
	Lelubre	Géologie.
	Trochain	Botanique.
	Gouyon	Mécanique rationnelle et appliquée.
	Bayet	Physique.
	Masdupuy	Chimie propédeutique.
	Lalague	Mathématiques générales.
	Dessens	Physique du Globe, Correspondant de l'Institut.
	Bouigue	Astronomie.
	Couchet	Physique.
	Lejeune	Chimie.
	Lascombes	Botanique.
	Asselineau	Chimie biologique.
	Mauret	Chimie systématique.
	Agid	Physiologie.
	Montant	Cryptogamie.
	Gautier	Physique propédeutique.
	Gumowski	Professeur associé.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	**Lacroix**	Techniques agricoles.
	Hamant	Botanique.
Mme	**Brunel**	Physiologie végétale.
Mlle	**Berducou**	Physiologie végétale.
MM.	**Maroni**	Chimie.
	Secondat	Zootechnie et Hydrobiologie appliquée.
	Miquel	Chimie propédeutique.
	Raynaud Pierre	Physiologie animale.
	Picca	Physique.
	Pulou	Minéralogie.
	Lacoste	Electrotechnique.
	Méric	Mathématiques appliquées.
	Beetschen	Biologie générale.
	Rey	Botanique.
	Crumeyrolle	Mathématiques.
	Cambou	Physique.
	David	Physique.
Mme	**Lecal**	Zoologie.

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	**Blanchard**	Mathématiques.
	Colin	Physique.
	Montel	Chimie.
	Coulon	Physique industrielle.
	Jourdheuil	Zoologie.
	Bugarel	Génie chimique.
	Médioni	Psychophysiologie comparée.
	Coulomb	Physique.
	Mascart	Mathématiques.
	Pommiez	Mathématiques générales.
	Sévely	Physique industrielle appliquée.
	Thirriot	Mécanique des Fluides.
	Mirouse	Géologie.
Mlle	**Lapeyre**	Mathématiques.
MM.	**Dat**	Mécanique des Fluides.
	Pilod	Physique.
	Larroque	Physique.
	Barrans	Chimie.
	Zalta	Chimie biologique.
	Jeannin	Chimie minérale.

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM.	**Boursin**	Mathématiques.
	Céa	Mathématiques M.P.C.
	Thénoz	Minéralogie et Géotechnie

SECRETARIAT

M.	**Argilas**	Conseiller Administratif des Services Universitaires.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0053

Ce travail a pu être réalisé au Laboratoire de Phytohormones, à la Faculté des Sciences de Toulouse, grâce aux subsides du Centre National de la Recherche Scientifique et à tous ceux qui m'ont encouragée et conseillée.

Je témoigne tout d'abord ma reconnaissance aux membres de mon jury qui m'ont fait le grand honneur de juger ce mémoire.

Monsieur F. NYSTERAKIS, Directeur de Recherches au C.N.R.S. m'a accueillie dans son laboratoire et c'est sous sa direction que ces recherches ont été poursuivies. Je fais grand cas de sa longue expérience des études biologiques et de ses réflexions et je lui exprime ma très déférente gratitude.

Monsieur le Professeur A. BRUNEL, avec la plus grande bienveillance, m'a donné ses conseils très judicieux pour la mise au point du manuscrit. Il m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma vive gratitude.

Monsieur P. CHOUARD, Professeur à la Sorbonne, dont les précieux conseils me furent d'un grand secours dès le commencement de ce travail, m'a toujours prodigué ses encouragements. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse et profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur honoraire H. GAUSSEN, correspondant de l'Institut, a été un de mes Maîtres de la Faculté; c'est dans son laboratoire que mes premiers travaux de recherche ont été effectués et il a bien voulu les guider. Il n'a cessé ensuite de me faire profiter de sa vaste érudition et de me donner ses très pertinents conseils. Je lui exprime ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur J. L. TROCHAIN avec beaucoup de bienveillance a accepté de juger ce mémoire; je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à mon jury de thèse et je le remercie très vivement.

Je tiens aussi à adresser particulièrement ma vive et respectueuse gratitude :

au Révérend Père CARLES, Directeur de Recherches au C.N.R.S., qui, avec une grande bonté, m'a souvent reçue dans son laboratoire; il m'a initiée aux techniques chromatographiques et m'a conseillée très sûrement pour l'extraction de substances inconnues;

à Monsieur J. P. NITSCH, sous-Directeur du Phytotron de Gif/Yvette, qui, avec un inlassable dévouement, m'a fait pro-

fiter de sa haute compétence sur les problèmes concernant les auxines. Ses suggestions m'ont été d'un grand prix.

J'ai été très touchée par l'aimable accueil de Monsieur le Professeur HURON qui a très généreusement mis à ma disposition certaines techniques de son laboratoire. Qu'il veuille bien recevoir mes plus vifs remerciements et l'assurance de ma respectueuse considération.

Je ne peux m'empêcher d'évoquer avec respect la mémoire du regretté Professeur W. H. SCHOPFER. Il a montré beaucoup d'intérêt dans la poursuite de ces recherches.

Enfin, je ne saurais oublier tous mes Maîtres de la Faculté, dont l'enseignement si magistralement dispensé, a aidé à ma formation, en particulier, Messieurs les Professeurs R. MORQUER, J. BLAIZOT et G. LASCOMBES. A tous, j'exprime ma vive reconnaissance.

Que Mademoiselle C. BULARD, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Dijon, la première à m'apprendre quelques techniques expérimentales utilisées en biologie, trouve également ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Madame P. COLOMBIES et à tous ceux qui, à divers titres, m'ont apporté leur aide, j'adresse mes remerciements très cordiaux.

En dernier lieu, qu'il me soit permis de rendre un témoignage affectueux et spécial à mon époux pour son efficace collaboration tout au long de ce travail.

INTRODUCTION

Il est connu depuis longtemps que lorsque des organismes vivent côte à côte, deux réactions particulièrement intéressantes peuvent en résulter. Il se produit soit une inhibition, soit une stimulation dans le développement de l'un ou même dans celui des deux organismes. Dans le cadre de ces interactions, rentrent plus spécialement les associations naturelles entre plantes supérieures et micro-organismes : mycorhizes ectotrophes et endotrophes, nodules bactériens des légumineuses, régis par des relations fort complexes, etc. Un certain nombre de problèmes soulevés par ce type de relations ont pu être ramenés à des exemples simples lorsqu'on a étudié des interactions de micro-organismes cultivés sur un même substratum.

Une stimulation unilatérale peut venir du fait que l'un des organismes décompose un des éléments de base du milieu commun, en le rendant assimilable au deuxième organisme. Par exemple *Mucor Rouxi* Wehmer décompose l'amidon en maltose que peut utiliser *Micrococcus roseus* (Schopfer, 1949). L'association nécessaire de *Nitrosomonas, Nitrobacter* et *Bacillus ramosus* tient au fait que *B. ramosus* peut libérer NH_4 qui, oxydé en nitrite par *Nitrosomonas,* est transformé en ion nitrique par *Nitrobacter.* L'auxoautotrophie en vitamine B_1 d'*Aspergillus niger* permet à *Phycomyces Blakesleeanus* de se développer sur un milieu synthétique exempt de vitamines (Schopfer, 1949). Mais les cas les plus intéressants, et aussi les moins étudiés, sont ceux où les métabolismes des deux organismes se complètent en une véritable symbiose par échange de facteurs indispensables. *Nematospora Gossypii* synthétise l'aneurine mais non la biotine, alors que *Polyporus adustus* produit la biotine mais non la pyrimidine (Kögl et Fries, 1937). *Mucor Ramannianus* forme de la pyrimidine mais non du thiazol, alors que c'est le contraire qui a lieu pour *Rhodotorula rubra.* Lorsqu'ils sont cultivés ensemble sur un milieu synthétique simple, l'échange des deux facteurs aboutit à la formation de vitamine B_1 pour chaque organisme d'où un développement normal des deux champignons (Müller et Schopfer, 1937; Müller, 1941).

Souvent au contraire, la culture côte à côte de deux organismes peut être néfaste pour la croissance de l'un d'eux. Déjà en 1871 Lister avait remarqué que la présence d'un champignon non identifié mais supposé être « *Penicillium glaucum* » rendait des

bactéries, présentes dans de l'urine, « complètement immobiles et languides ». En 1877, Pasteur et Joubert avaient pu voir que le bacille charbonneux, inoculé en même temps que certaines « bactéries inoffensives », ne produit pas d'infection chez l'animal. En 1889, Vuillemain employait pour la première fois le mot « antibiose ». Enfin, en 1929, Fleming mit en évidence que les filtrats d'un *Penicillium notatum* avaient une activité antibactérienne très puissante sur les staphylocoques, le streptocoque pyogène et le bacille diphtérique. Il avait vu une moisissure détruire des bactéries.

Au cours des expériences préliminaires qui m'initiaient au travail de Recherche, mon Directeur, le Dr F. Nysterakis, m'avait demandé d'observer la croissance de *Nectria galligena* Bres., cultivé sur milieu synthétique en présence de doses inhibitrices d'acide β-indolyl-acétique (A.I.A.) et de divers métabolites naturels et synthétiques susceptibles de se comporter comme des antagonistes de cette action inhibitrice. Je constatais alors qu'une des cultures de *N. galligena,* poussant sur le milieu de base additionné de doses d'A.I.A. nettement inhibitrices pour sa croissance, se développait normalement. L'examen du tube en question montrait qu'il était infecté par *Rhizopus nigricans* Ehr. La présence de *R. nigricans* rendait donc le milieu contenant de l'A.I.A. non inhibiteur pour *N. galligena.* La levée de cette inhibition de croissance, chez *N. galligena,* au moyen d'une substance diffusible sécrétée par *R. nigricans* venait immédiatement à l'esprit. Une telle hypothèse pouvait prendre appui sur les observations d'Umrath (1939), non poursuivies par la suite. Cet auteur avait en effet montré que des extraits de filaments de *R. nigricans* se comportent comme des antagonistes de l'action inhibitrice de fortes doses d'A.I.A. sur la croissance de *Phycomyces Blakesleeanus.*

La mise en évidence de l'interaction *R. nigricans* — *N. galligena,* établie ensuite sous des conditions variées, m'a ainsi incitée à entreprendre « l'étude des interactions de croissance de champignons cultivés en présence d'A.I.A. ». En fait, principalement deux problèmes sont soulevés si l'on recherche la cause de l'activité antiauxinique d'un organisme susceptible de rétablir la croissance normale, en présence d'A.I.A., d'un autre organisme.

— S'agit-il d'une capacité de synthèse dans les filaments, puis d'excrétion dans le milieu de culture de substances capables de renverser l'action inhibitrice de l'auxine sans dégrader ce dernier corps ?

— ou bien, l'activité antiauxinique doit-elle être attribuée à des systèmes enzymatiques type auxine-oxydase, capables de détruire l'auxine ?

J'ai voulu alors préciser, d'une part, laquelle des deux hypothèses permet d'expliquer la disparition de l'effet inhibiteur de l'A.I.A. lors d'une interaction du type initialement observé entre *N. galligena* et *R. nigricans,* d'autre part, dans quelle mesure les

diverses expérimentations entreprises sont susceptibles de circonscrire le mode d'action de l'auxine dans son effet inhibiteur sur la croissance des champignons.

J'ai utilisé des champignons inférieurs. Les micro-organismes choisis se montrent particulièrement intéressants par suite de leur développement relativement rapide et de leurs besoins nutritifs très réduits. Il s'agit de *Nectria galligena* Bres., *Rhizopus nigricans* Ehr. et *Fusarium vasinfectum* Eck. En présence de doses même faibles d'A.I.A., la croissance de *Nectria galligena* est inhibée; au contraire, la croissance de *Rhizopus nigricans* ou celle de *Fusarium vasinfectum* n'est pas modifiée par des doses même importantes de cette auxine, telles que 100 à 200 mg par litre. Je n'ai pas inclus ici de mise au point d'ensemble des travaux concernant les diverses voies de recherche poursuivies, mais la bibliographie concernant chaque problème soulevé sera constamment confrontée aux résultats exposés.

Je traiterai d'abord des conditions expérimentales et des techniques utilisées. Puis j'exposerai les résultats concernant les deux interactions étudiées :

Rhizopus nigricans — *Nectria galligena*

Fusarium vasinfectum — *Nectria galligena*

Le métabolisme des trois champignons en présence ou non d'A.I.A. sera ensuite comparé et une étude particulière de l'organisme sensible à l'A.I.A. sera effectuée. Enfin une discussion suivie de conclusions déterminera les éléments positifs de ce travail et les possibilités de nouvelles recherches qui en découlent.

CONDITIONS EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES

La souche de *Nectria galligena* Bres. provient de la mycothèque internationale de Baarn. *Fusarium vasinfectum* Eck. (ou *Fusarium oxysporum f. vasinfectum* (Atk.) Snyd. et Hansen) m'a été fourni par le Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris sous le n° 532. Enfin, en ce qui concerne *Rhizopus nigricans* Ehr., deux souches ont été utilisées. Les premiers essais ont été réalisés avec une culture du champignon que j'avais isolé au laboratoire. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de la souche n° 258 du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Dans les deux cas, *R. nigricans* présente les mêmes propriétés biologiques. Aussi, ai-je adopté la souche n° 258 pour la suite de l'expérimentation de manière à ce qu'on puisse se procurer facilement un matériel identique. Des cultures monospores de chacun des trois champignons ont servi pour l'ensemble de l'expérimentation.

Les champignons sont cultivés soit en milieux liquides (1) dans des erlenmeyers de 300 ml (30 ml de milieu/fiole), soit sur substratums gélosés dans des boîtes de Petri (110 mm de diamètre) recevant chacune 30 ml de milieu, ou dans des tubes à essais de 200 × 20 mm contenant chacun 20 ml de milieu. Tous les essais se déroulent à l'obscurité, dans une pièce conditionnée à une température de 24 °C et à un taux d'humidité de l'air de 70 % environ.

L'estimation de la croissance des colonies mycéliennes est souvent faite en se basant uniquement sur la croissance en surface et le poids de matière vivante formée. Mais ces critères ne sont entièrement valables que si le développement des organismes demeure normal. Aussi, ai-je toujours vérifié sur ce point les réactions de mes champignons. Ni la disparition de la sporogénèse, ni l'accumulation massive de pigments anormaux dans le substratum et les hyphes, phénomènes liés à des déséquilibres nutritionnels si bien mis en évidence chez les champignons, notamment par Morquer et ses collaborateurs (1963), n'ont été constatées au cours des différents essais effectués. Il s'ensuit que les critères de croissance pondérale et de développement en surface des colo-

(1) Les caractéristiques des différents milieux de culture ainsi que certaines techniques particulières seront données au cours des exposés expérimentaux.

nies traduisent fidèlement l'évolution de la croissance, en conditions normales, de mes organismes.

Pour pouvoir mieux comparer les phénomènes étudiés dans ce travail j'observe, en général, la croissance pendant les 15 jours qui suivent l'ensemencement, temps au bout duquel l'action de ce qui est introduit par l'expérimentation n'est pas encore suivie de la « réaction physiologique » de l'organisme.

L'évaluation de la croissance pondérale est faite de la façon suivante. Dans le cas de milieux liquides, le mycélium est retiré de la fiole, lavé dans l'eau distillée, égoutté rapidement et séché pendant quelques secondes entre des feuilles de papier filtre et enfin placé dans une étuve à dessiccation à 105 °C. Dans le cas des milieux solides, la séparation des colonies à partir du substratum gélosé est effectuée comme suit : après avoir ajouté 20 ml d'eau et 2 gouttes d'acide chlorhydrique concentré dans chaque tube, on chauffe pendant 15 minutes à 105 °C sous pression constante. La gélose est alors liquéfiée et les filaments peuvent être retirés et traités comme il est décrit précédemment pour les milieux liquides.

Les colonies de l'ensemble de chaque série sont pesées globalement. Le poids ainsi trouvé, divisé par le nombre de cultures (10 en général, 6 quelquefois), constitue le poids moyen d'une culture.

Puis un certain nombre de techniques analytiques, que nous allons examiner, sont simultanément utilisées pour essayer de préciser quelques-unes des réactions mises en évidence lors de la croissance :

— analyse chromatographique des acides organiques et aminés,

— dosage colorimétrique et chromatographie des substances indoliques,

— dosages bactériologiques de certaines vitamines,

— enfin, recherche de substances inconnues : les modes d'extraction, de fractionnement sur diverses résines et sur célite et les méthodes d'analyse chromatographique sur papier, seront décrits au cours du travail expérimental.

Enfin, tout au long de ces recherches analytiques, à chaque étape des divers fractionnements et pour toute substance isolée et extraite de son support, la croissance de *N. galligena* en présence ou non d'A.I.A. est continuellement éprouvée.

EXTRACTION ET CHROMATOGRAPHIE DES ACIDES ORGANIQUES ET AMINES

Sur des lots de 50 cultures en moyenne, développés en milieux liquides, la séparation des acides aminés et amides et des acides organiques est effectuée selon des techniques classiques utilisées et mises au point au laboratoire de J. Carles.

a) *Extraits de filaments.*

Les hyphes sont retirés du milieu de culture, rincés plusieurs fois à l'eau bidistillée; puis, pour extraire les composés hydrosolubles, les mycéliums sont alors immédiatement stérilisés à 100 °C pendant 30 minutes dans une quantité d'eau bidistillée équivalente à celle du milieu où ils se sont développés. Pour l'obtention des extraits alcooliques, ces mêmes mycéliums sont ensuite finement broyés et une première extraction est faite dans l'éthanol à 70° bouillant pendant 15 minutes avec un dispositif à reflux. Après décantation de l'alcool, a lieu pendant vingt minutes une deuxième extraction à l'éthanol à 70°; enfin, après centrifugation, les extraits alcooliques obtenus sont concentrés sous vide à une température d'environ 40 °C. Les extraits hydrosoluble et alcooliques sont alors expérimentés, soit seuls, soit ensemble.

b) *Les milieux de culture* sont filtrés sur bougies Chamberland 5 L 3, stérilisés à 100 °C pendant 30 minutes et séchés ou non sous vide à 40 °C.

Les différents extraits et filtrats sont ensuite *passés sur colonnes de résine échangeuses d'ions :*

Dowex 50 à groupements sulfoniques, échangeur de cations fortement acide, de grande porosité (× 4) et d'une grosseur de grains de 150 à 300 microns (50/100 mesh/sec).

Dowex 1 à groupements d'ammonium quaternaire, échangeur d'anions fortement basique, de même porosité et de même grosseur de grains que Dowex 50.

La fraction retenue sur Dowex 50 (dite « basique ») riche en acides aminés et substances voisines, est éluée par de l'ammoniaque 2 N. La fraction retenue sur Dowex 1 (dite « acide ») contenant principalement les acides organiques, est éluée par du carbonate d'ammonium 2N. Enfin la fraction non retenue par les résines, dite « non ionique » qui renferme surtout des glucides et des protides, n'a été étudiée qu'occasionnellement. Chacune des fractions « acide », « basique » et « non ionique » est évaporée sous vide à 40 °C. Elles sont ensuite, soit incorporées aux milieux de culture, soit traitées par chromatographie de partage sur papier.

Pour les acides aminés, j'ai suivi des techniques de chromatographie classique : développement sur papier Arches 302 par les solvants butanol - acide acétique - eau (4-1-5) (v/v/v) en première dimension et phénol saturé d'eau en présence de cyanure de sodium en deuxième dimension. Les révélateurs utilisés sont la ninhydrine, soit seule, soit avec la collidine à 5 %, et l'isatine.

Pour les acides organiques, la chromatographie descendante bidimensionnelle sur papier Arches 302 est conforme à la méthode de Carles, Schneider et Lacoste (1958). J'utilise pour le développement en première dimension le solvant alcool éthylique à 96° - ammoniaque concentré (95-5) (v/v) et, en deuxième dimension,

le solvant butanol-acide formique-eau (4-1-5) (v/v/v). Parfois aussi, un solvant complémentaire est utilisé pour différencier certains corps comme l'acide glycolique par rapport au pyrrolidone carboxylique (phénol saturé d'eau à 1 % d'acide formique). Après examen de la fluorescence aux rayons U.V., j'emploie comme révélateurs, suivant la technique précitée, l'aniline, le nitrate d'argent, le ferrocyanure et le ferricyanure. La position des taches chromatographiées est calculée à partir du Rf de l'acide glycolique que Carles et coll. ont fait égal à 100 (Rg = 100).

En ce qui concerne les évaluations quantitatives, je ferai remarquer qu'au stade de ce travail il était, avant toute chose, essentiel de cerner les problèmes soulevés et de préciser l'allure des phénomènes mis en cause. Aussi l'emploi d'un photomètre de Leres ou bien de Blet, type Eral, mis à ma disposition, suffisait pour définir les limites de mon expérimentation.

J'ai évalué alors densitométriquement, au photomètre enregistreur de Leres, les taches chromatographiées d'acides organiques ou aminés, par rapport à des taches dont je connaissais la teneur. Cet appareil fournit en effet une courbe sur papier photographique permettant, par planimétrie, de chiffrer les proportions relatives des différentes fractions de la solution analysée par chromatographie. J'ai pu ainsi établir les proportions relatives de chacun des acides en question. En aucun cas, il ne s'agit de dosages mais bien de mesures comparatives, dans des conditions définies, des divers éléments contenus dans un extrait de mycélium de champignon ou de son milieu de culture. C'est pour cela que je parle d'évaluation plutôt que de mesure.

EXTRACTION, DOSAGE ET CHROMATOGRAPHIE DES SUBSTANCES INDOLIQUES

Au cours de mes essais, si j'ai eu à étudier les capacités de synthèse des composés auxiniques dans les trois champignons tests, mon but principal était de suivre surtout l'évolution de l'A.I.A. exogène au cours de la croissance de *N. galligena*. J'ai donc choisi les méthodes d'étude des auxines acides libres.

L'extraction de l'auxine à partir des milieux gélosés pose un problème. Il est possible de procéder à la liquéfaction du substratum par chauffage pendant 5 minutes à 105 °C en présence de quelques gouttes d'acide chlorhydrique (Nysterakis, 1961). Mais, pour éviter au maximum des modifications possibles de substances dans le milieu de culture ainsi que dans le mycélium, je préfère procéder à froid.

Parmi plusieurs solvants essayés (éther, éthanol, méthanol, acétone), l'éther se montre le plus favorable à la migration de l'auxine en milieu gélosé. Ce solvant permet, en outre, d'éviter l'altération des composés indoliques et par suite, son emploi parmi d'autres est préconisé (Stowe et Thimann, 1954; Nitsch et Nitsch,

1955; Pilet, 1961). Nitsch (1956 et 1960) considère, avec le matériel qu'il utilise, que le méthanol absolu à la température de 0 °C convient le mieux. En ce qui me concerne, je procède à des extractions, à 3 °C pendant 24 h, avec de *l'éther* (1) (ether purissimum de Merck, 20 ml/tube de culture) que je traite préalablement pour éliminer les peroxydes (Brunel, 1948). Notons que la totalité de l'A.I.A. contenu dans le milieu gélosé ne passe pas dans l'éther. Kovoor (1964) cherchant à enlever tout l'A.I.A. du lait de noix de coco, a aussi observé des extractions incomplètes par l'éther. Mais étant donné que j'opère rigoureusement de la même façon tout au long des différentes expériences, les quantités qui migrent dans l'éther sont comparables d'une série à l'autre. J'exposerai en premier lieu ce qui a trait à la partie extractible par l'éther et en deuxième lieu, comment j'évalue ce qui a pu rester dans le milieu gélosé après extraction par l'éther.

a) *Extrait éthéré.*

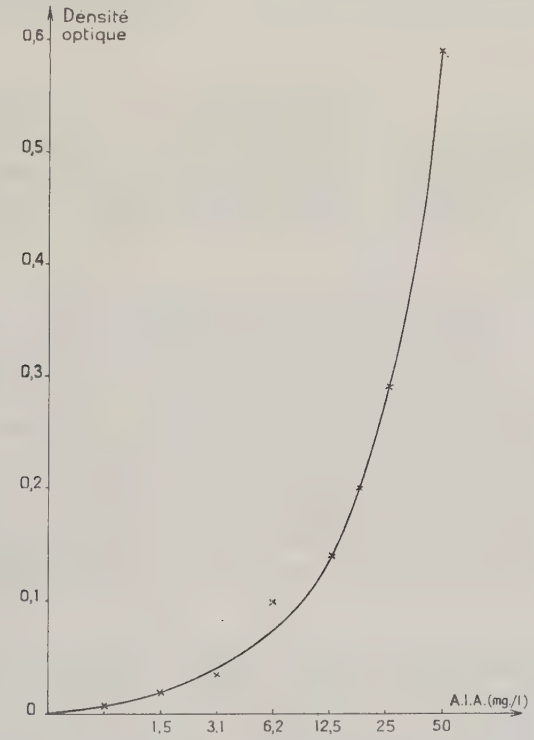


FIGURE 1

Courbe étalon de la variation de la densité optique en fonction de la concentration en A.I.A. de solutions éthérées, établie au photocolorimètre de Blet (530 mμ).

(1) Pour éviter l'évaporation de l'éther, je prends toujours soin de remplacer le bouchon en coton hydrophile utilisé pendant la croissance du champignon par un bouchon en caoutchouc recouvert d'une toile en polyvinyle.

Le dosage colorimétrique sur l'extrait éthéré est effectué suivant la méthode de PILET (1957) dont j'ai modifié certains détails : le mélange de 1 ml d'extrait éthéré + 8 ml de réactif de SALKOWSKI (préparé suivant PILET 1957) + 1 ml d'éthanol absolu, est incubé pendant 30 minutes à 40 °C à l'obscurité. Le dosage se fait alors à l'aide du photocolorimètre de BLET (filtre 530 mμ) et les valeurs sont exprimées en densités optiques. Le zéro est établi avec 1 ml d'éther pur + 8 ml de réactif de SALKOWSKI + 1 ml d'éthanol absolu et la courbe étalon, construite à l'aide de solutions éthérées d'A.I.A. en concentrations croissantes, permet dans le cadre de mes expériences d'établir une équivalence immédiate entre la densité optique et la quantité d'A.I.A. qui lui correspond (fig. 1). Il est possible d'obtenir une précision dans la lecture des densités optiques de l'ordre de 0,01 avec l'appareil utilisé. Mais étant donné que la réaction colorée ne suit pas la loi de BEER-LAMBERT, il est préférable de ne considérer la courbe d'étalonnage que pour les valeurs de densité optique supérieures à 0,05, correspondant à 3,9 mg/litre d'A.I.A. Cette manière d'opérer m'a fait obtenir des résultats fidèles et stables.

La recherche chromatographique sur l'extrait éthéré séché à 40 °C me permet de reconnaître ensuite si, dans les dosages colorimétriques, l'A.I.A. seul est mesuré ou si d'autres composés indoliques sont entrés aussi en ligne de compte. Une chromatographie monodimensionnelle descendante sur papier Arches 304 est effectuée.

J'ai choisi pour solvant le mélange isopropanol - ammoniaque - eau conseillé notamment par BENNET-CLARK, TAMBIAH et KEFFORD (1952), von DENFFER, BEHRENS et FISCHER (1952), SEN et LEOPOLD (1954), NITSCH et NITSCH (1955). J'utilise ce mélange dans les proportions de 10-1-1 (v/v/v). Le réactif d'EHRLICH au p-diméthylaminobenzaldéhyde, modifié par BERRY, SUTTON, CAIN et BERRY (1951) et le réactif de SALKOWSKI au chlorure ferrique - acide perchlorique, modifié par GORDON et WEBER (1951) sont employés. Une évaluation semi-quantitative des taches chromatographiées se fait au photomètre de LERÈS comme il est mentionné précédemment (p. 16).

b) *Etude du milieu gélosé après extraction par l'éther des composés indoliques :*

Comme il est signalé ci-dessus, *l'éther n'entraîne pas la totalité de l'A.I.A. ou des composés indoliques* exogènes ou synthétisés par les organismes étudiés. Pour préciser si possible leur nature et leur quantité, une expérimentation complémentaire est effectuée. Elle a surtout comme but de réunir des renseignements susceptibles de montrer les limites que l'on peut accorder à l'interprétation des résultats obtenus avec l'extrait éthéré.

A cet effet, des cubes de gélose prélevés dans des milieux non ensemencés par le champignon et des cubes de gélose provenant des milieux ensemencés mais non envahis par les filaments, sont posés sur le papier à l'emplacement qui est destiné à recevoir les taches initiales et séchés par un dispositif à air non chauffé. Je prends 0,4 ml de milieu gélosé après extraction éthérée. Cette quantité : 1/50e du milieu sur lequel a poussé le champignon, est équivalente à la quantité utilisée pour effectuer une tache avec l'extrait éthéré. Puis le développement chromatographique, l'évaluation de la nature des taches et leur estimation quantitative ont lieu comme pour l'étude de l'extrait éthéré.

DOSAGE BACTERIOLOGIQUE DE LA BIOTINE

La biotine étant présente à de très faibles doses chez les êtres vivants, son dosage nécessite un moyen de mesure très précis. Sur ce point, les tests microbiologiques offrent souvent un matériel de choix. Dans ce but, divers organismes ont été proposés : *Staphylococcus aureus* (Porter et Pelczar, 1940), *Clostridium butylicum* (Lampen, Kline et Peterson, 1941), *Streptococcus fæcalis liquefaciens* (Broquist et Snell, 1951, etc.). Depuis le travail de Wright et Skeggs (1944) on utilise principalement *Lactobacillus arabinosus* 17-5, souche A.T.C.C. n° 8014.

Dans mes expériences je me sers de *L. arabinosus* A.T.C.C. n° 8014 qui m'a été fort obligeamment fourni par l'Institut Pasteur de Paris. J'emploie également *Streptococcus fæcalis liquefaciens* (souche γ 30 022 groupe D), isolé par Lapchine (1954) au laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Toulouse.

Pour *L. arabinosus*, je suis la méthode de Wright et Skeggs (1944), légèrement modifiée par Strong (1955) en ce qui concerne le traitement de l'hydrolysat de caséine pour le débarrasser de toutes traces de biotine. La méthode de Wright et Skeggs repose sur le principe que la vitesse de développement des bactéries est proportionnelle à la quantité du facteur de croissance indispensable, qui est ici la biotine. En conséquence, je fournis alors au milieu de base exempt de biotine, d'une part, des quantités croissantes d'extraits provenant des milieux de culture ou des filaments de *R. nigricans* ou bien de biotine extraite à partir des milieux de culture de *R. nigricans*, d'autre part, des doses données de biotine pure (Hoffmann La Roche) de 0,00001 mg à 0,02 mg/l. Après 24 h d'incubation à 33 °C, la croissance de l'organisme test est mesurée par dosage turbidimétrique au photocolorimètre de Blet (filtre 580 mμ). Simultanément, mais au bout de 72 h, la quantité d'acide lactique formée par *L. arabinosus* est évaluée à l'aide d'une solution de NaOH à 0,1 N en présence de bleu de bromothymol comme indicateur. La quantité d'acide lactique libérée est fonction de la multiplication bactérienne.

Pour *S. fæcalis liquefaciens*, après m'être assurée que cette souche ne synthétise pas de biotine, je suis le même mode opératoire. Dans mes expériences, ce micro-organisme se montre moins sensible que *L. arabinosus* à l'action de la biotine.

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE DES INTERACTIONS DE CROISSANCE DE CHAMPIGNONS INÉGALEMENT RÉSISTANTS A L'ACIDE β-INDOLYL-ACÉTIQUE EXOGÈNE

Cette première partie est consacrée à l'analyse de deux types d'interactions d'organismes en présence de doses élevées d'auxine exogène. L'action exercée par deux champignons résistant à l'A.I.A., *Rhizopus nigricans Ehr.* et *Fusarium vasinfectum* Eck., dans la levée de l'inhibition de croissance provoquée par A.I.A. chez un autre organisme très sensible à ce corps, *Nectria galligena* Bres., est étudiée. Ces interactions sont ensuite définies et leurs diverses caractéristiques mises en valeur.

CHAPITRE I

INTERACTION *RHIZOPUS NIGRICANS* - *NECTRIA GALLIGENA* EN PRESENCE D'ACIDE β-INDOLYL-ACETIQUE

Au cours de ce chapitre nous comparerons tout d'abord le développement des deux organismes cultivés isolément sur milieu témoin additionné ou non d'A.I.A. exogène. Nous chercherons en même temps à définir, d'une part, les capacités de synthèse d'auxine des deux champignons, d'autre part, leur pouvoir de destruction de l'A.I.A. exogène dans les conditions expérimentales utilisées.

La mise en évidence de l'interaction de croissance en cultures simultanées ainsi que la recherche des facteurs, sécrétés par *R. nigricans,* responsables de la levée de l'inhibition provoquée par l'A.I.A. chez le test *N. galligena,* seront ensuite examinées.

I. — DEVELOPPEMENT DES DEUX ORGANISMES CULTIVES ISOLEMENT SUR LE MILIEU DE BASE ADDITIONNE OU NON D'AUXINE EXOGENE

La biologie de *Nectria galligena,* et en particulier sa nutrition, est actuellement bien connue (cf. notamment Cayley [1921], Crowdy [1947], Berducou [1957], Saure [1961]). Le champignon a de faibles exigences nutritionnelles : sa croissance et sa sporulation sont satisfaisantes sur des milieux synthétiques simples, tels que le Knop ½ glucosé et gélosé, additionné ou non de solution de Berthelot renfermant des éléments minéraux oligodynamiques. Bien que Berducou considère que le d-fructose constitue le meilleur aliment carboné, cet auteur montre aussi que des doses de glucose de 30 g/l permettent à *N. galligena* de pousser convenablement. Les nitrates constituent la meilleure source d'azote pour sa croissance. Certains acides aminés (l [+] alanine, l [—] cystéine, l [—] tyrosine) et quelques vitamines (biotine, pantothénate de Ca, vitamine C) et l'adénine activent la croissance du microorganisme. Ce dernier paraît s'accommoder de très larges variations de pH pour sa croissance. Par contre, les limites d'une sporulation normale se situent entre pH 5 et 6,5. Les diverses capacités de synthèse de *N. galligena* ont été peu étudiées. Cependant, il est

connu qu'un des produits de son métabolisme est l'auxine. Il en synthétise de faibles quantités sur milieu Knop ½ glucosé et gélosé avec solution de Berthelot : pour des cultures âgées de 30 jours, 90 µg dans les filaments par kilogramme de matière fraîche et 102 µg dans le milieu où s'est développée la même quantité de champignon (Berducou, 1957). Enfin, selon ce même auteur (1950) de très faibles doses d'A.I.A. exogène (0,02 mg/l) accélèrent la croissance de *N. galligena* alors que 0,2 mg/l suffit déjà pour provoquer une nette inhibition (1).

De la biologie de *Rhizopus nigricans*, très étudiée depuis longtemps, je signalerai seulement que, comme de nombreuses Mucorinées, ce champignon assimile parfaitement l'azote ammoniacal, mais fort peu l'azote nitrique (Bach, 1927 a, b). Une bonne croissance nécessite aussi l'apport d'oligo-éléments tels que le manganèse, le cuivre et le zinc, mais le champignon peut se développer quand même faiblement en leur absence (Mac Hargue et Calfee, 1931; Foster et Waksmann, 1939 a). Enfin, l'utilisation d'un tampon (citrate-soude) pour l'ajustement du pH à 6,4 en s'opposant à l'acidification qui apparaît au cours du développement de *R. nigricans*, permet généralement la croissance régulière de cet organisme. Ses divers pouvoirs de synthèse ont déjà fait l'objet de nombreux travaux (Foster et coll., 1939, 1941, 1948, 1949; Waksmann et coll., 1933 et 1938). Il sera particulièrement retenu ici que l'auxine est aussi pour *R. nigricans* un produit normal de son métabolisme. Il en sécrète des quantités importantes soit 320 µg pour 6 l de filtrat du milieu où a poussé pendant 7 jours le champignon (Kögl et Kostermans, 1934). Notons aussi que la croissance de *R. nigricans* n'est pas accélérée par de faibles doses d'auxine exogène et n'est inhibée que par de très hautes concentrations de ce corps (1/1 000) selon Umrath (1939).

Dans mes propres expériences, par souci d'uniformité dans les conditions expérimentales, j'ai choisi pour l'étude des interactions de croissance un milieu synthétique minimum où *N. galligena* et *R. nigricans* peuvent se développer de façon satisfaisante. Il dérive du milieu de Westergaard et Mitchell (1947) qui contient par litre : KH_2PO_4, 1 g; KNO_3, 1 g; $MgSO_4$, 7 H_2O, 0,5 g; NaCl, 0,1 g; $CaCl_2$, 0,1 g; saccharose, 20 g; biotine, 5 µg; traces d'oligo-éléments; agar, 15 g; le pH est de 6,5. J'ai modifié ce milieu en supprimant la biotine et les oligo-éléments et en remplaçant le saccharose par 30 g de glucose; de plus, je l'ai ajusté au pH 5,5 et l'ai utilisé avec ou sans agar (13 g/l), que je purifie suivant la méthode de Robbins et Ma (1941) (2). Dans toutes mes expériences, ce milieu a été employé comme milieu de base.

Je constate que sur ce substratum, *N. galligena* se développe

(1) D'après les résultats de Berducou, cette inhibition serait due au ralentissement de la mérèsis et de l'auxésis de *N. galligena*.

(2) Par traitement pyridine-alcool destiné à éliminer toutes traces de biotine.

aussi bien que sur KNOP ½ glucosé (tableau 1), tandis que *R. nigricans* présente une croissance fort ralentie mais régulière et fructifie normalement par rapport à son développement sur d'autres milieux tels que celui de BACH (1927 a) (1).

TABLEAU 1

Croissance pondérale (Poids sec en mg) de R. nigricans *et* N. galligena *cultivés sur divers milieux de base contenant ou non l'A.I.A.*

Organisme	Milieu de	Jours après l'ensemencement	Croissance — A.I.A (M/l) (1)		
			0	3.10^{-4}	6.10^{-4}
R. nigricans	BACH	8	270	272	286
		15	290	297	295
	WESTERGAARD et MITCHELL modifié	8	15	16	16
		15	20	22	21
N. galligena	WESTERGAARD et MITCHELL modifié	8	15	7	5
		15	23	10	5,1
	KNOP ½ glucosé	15	21	11	8

(1) Tout au long de ce travail, j'exprimerai le plus souvent les concentrations des corps purs utilisés en Moles par litre de milieu de base (M/l). Dans le cas de l'A.I.A., par exemple, M/l = 175 g/litre.

Les réactions de croissance des deux champignons sur milieux synthétiques étant précisées, il était possible d'éprouver, sous nos conditions expérimentales, d'une part, leur capacité de synthèse en A.I.A., d'autre part, leur résistance aux fortes doses d'A.I.A. exogène.

1° Conformément aux résultats de mes prédécesseurs, *N. galligena* et *R. nigricans* synthétisent tous deux de l'auxine. J'ajouterai seulement que *R. nigricans* excrète en plus dans son milieu de culture du tryptophane et de l'acide β-indolyl-propionique. Ensuite, j'ai voulu vérifier aussi quelle était l'action de fortes doses d'A.I.A., exogène cette fois, sur la croissance des souches de *N. galligena* et *R. nigricans* que je possède. A cet effet, j'ai ajouté au milieu de base des quantités d'A.I.A. comprises entre $1,5.10^{-5}$ et 6.10^{-4} M/l

(1) Chaque fois que l'on désire de grandes quantités de filaments de *R. nigricans*, il est préférable d'utiliser le milieu de BACH qui renferme par litre : KH_2Po_4, 1,36 g; KCl, 0,645 g; $MgSO_4$, 7 H_2O, 0,492 g; $ZnSO_4$, 7 H_2O, 0,010 g; $(NH_4)_2$ SO_4, 6,70 g; glucose, 40 g; tampon citrate-soude nécessaire pour amener le pH au voisinage de 6,4. Lorsque pour une raison particulière, ce milieu sera employé, il en sera fait mention.

d'A.I.A. *N. galligena* a sa croissance déjà fortement inhibée avec 3.10^{-5} M/l d'A.I.A. Au contraire, la croissance de *R. nigricans* reste pratiquement inchangée. Ce champignon présenterait même quelquefois une croissance supplémentaire (environ de 15 % par rapport à la croissance du témoin) pour les plus fortes doses d'A.I.A. (figure 2 et tableau 1).

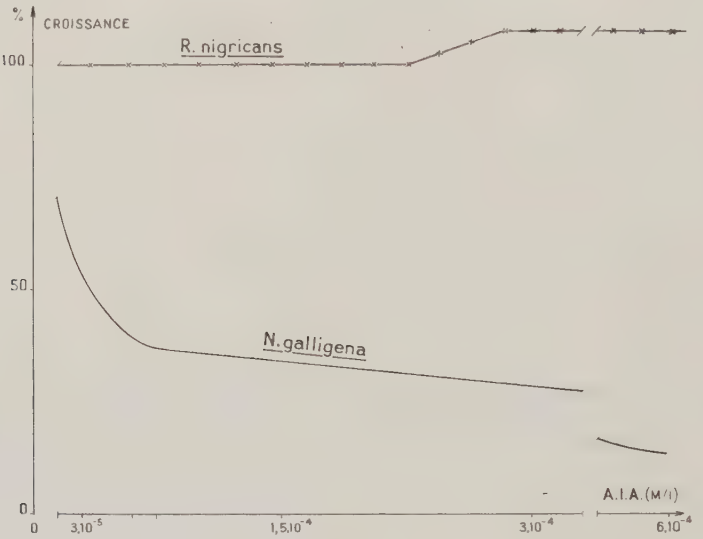


FIGURE 2

Croissance pondérale de N. galligena *et de* R. nigricans (*en pour cent de la croissance du témoin* = 100) *au* 15e *jour de culture, sur milieu de base contenant ou non des doses croissantes d'A.I.A.*

2° *J'ai voulu alors savoir si la plus grande résistance à l'auxine exogène de* R. nigricans *peut s'expliquer par une capacité plus grande de destruction de l'auxine que celle de* N. galligena. En effet, depuis les premières observations de Thimann (1934) et de Van Overbeek (1935), l'importance accordée aux systèmes de dégradation enzymatique de l'auxine n'a cessé d'augmenter. Des mises au point récentes, telles que celles de Ray (1958), de Gruen (1959) et de Pilet (1961), résument bien nos connaissances sur ce problème.

Je noterai simplement ici que, chez les plantes supérieures, un premier type de système enzymatique de destruction de l'auxine comprenant une peroxydase couplée à un système flavoprotéinique a été mis en évidence chez *Pisum sativum* par Galston, Bonner et Baker (1953). Ce système serait aussi présent chez le raifort (Kenten, 1955), *Lupinus albus* (Stutz, 1957) et le navet (Yamasaki et Souzu, 1960). Mais d'autres enzymes du groupe des phénolases, peuvent aussi se rencontrer. Par exemple, un système acide chlorogénique-phénolase serait capable de détruire l'A.I.A. dans les feuilles de *Prunus* (Tomaczewski, 1959).

Parmi les micro-organismes, un système flavoprotéine-peroxydase analogue à celui des plantes supérieures a été mis en évidence chez *Omphalia flavida* (Ray, 1958); il peut de plus être associé à une oxydase, comme chez *Melampsora lini* (Oaks et Shaw, 1960). D'autre part, *Polyporus versicolor* forme une oxydase extracellulaire (Tonhazy et Pelczar, 1954; Fahraeus et Tullander, 1956), que Fahraeus (1958 et 1961) a identifié comme étant une laccase, sans activité peroxydasique. Chez les lactaires, une oxydase, qui serait aussi probablement une laccase, est capable d'oxyder l'A.I.A. (Legrand, 1957). Enfin, une tyrosinase présente chez *Psalliota campestris*, oxyderait l'A.I.A. en présence de catéchol ou de pyrogallol (Briggs et Ray, 1956).

J'ai cru alors important d'éprouver les capacités de destruction de l'auxine par R. nigricans ou *N. galligena*, tout au long de la croissance, en recherchant les quantités d'A.I.A. présentes dans les milieux de l'un ou l'autre des deux champignons lorsque ce corps est introduit de façon exogène. Dans ce but, je dose colorimétriquement l'A.I.A. extrait par l'éther de ces milieux gélosés, et je vérifie chromatographiquement sa nature et si d'autres composés indoliques n'ont pas pu fausser le dosage. Puis j'analyse suivant la méthode déjà décrite, la quantité d'A.I.A. restant dans le milieu gélosé après extraction de l'A.I.A. soluble dans l'éther. Simultanément, les mêmes opérations sont effectuées sur milieux non ensemencés.

Cas de *N. galligena*.

a) *A.I.A. contenu dans la fraction éthérée.*

Les dosages colorimétriques et l'analyse chromatographique ont lieu tous les jours jusqu'au 11e jour, puis au 13e jour et au 15e jour.

— *Les dosages* montrent que l'A.I.A. apporté (et tous les indols qui auraient pu apparaître) subit parfois une très faible diminution au 8e jour de croissance, toujours plus marquée dans les milieux ensemencés que dans ceux qui ne le sont pas. Ceci semble en contradiction avec les faits antérieurs, à savoir que *N. galligena* est capable de synthétiser de l'A.I.A., mais j'aurai l'occasion de revenir sur ce point. Ces phénomènes s'accentuent au 15e jour (figure 3).

L'analyse chromatographique des indols solubles dans l'éther démontre que ce qui a été dosé est uniquement de l'A.I.A., et qu'aucune autre substance de nature indolique n'est présente ici. On remarque que 19,5 mg d'A.I.A. sont passés dans l'éther, représentant 42 % de la quantité exogène (1) (tableau 2).

(1) L'A.I.A. subit une légère dégradation au cours de la stérilisation. Aussi je prends pour base égale à 100 %, la quantité d'A.I.A. dosée au début de l'expérimentation dans le milieu non gélosé. En outre, l'A.I.A. est sujet au cours du temps, même à l'obscurité, à une légère inactivation.

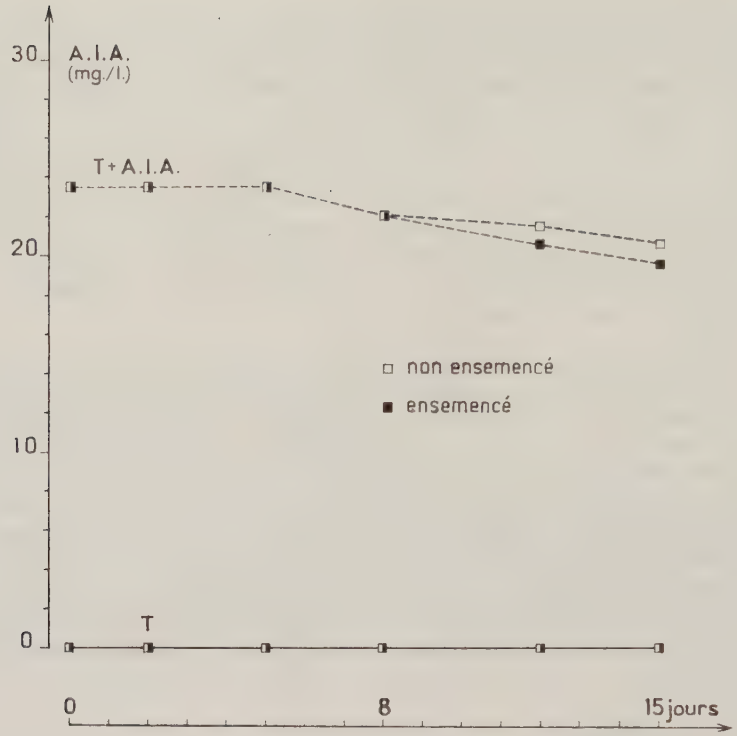


FIGURE 3

Evolution, en fonction du temps, de la quantité d'A.I.A. extraite par l'éther *du milieu de base additionné ou non d'A.I.A. exogène, lorsque* N. galligena *y est ou non ensemencé.*

TABLEAU 2

Quantité de composés indoliques (exprimée en mg/l d'A.I.A. et en % (100 = *quantité initiale d'A.I.A. exogène après stérilisation) présente dans le milieu de base lorsque* N. galligena *a été ou non ensemencé (E : dans l'extrait éthéré; R : quantité restant dans la gélose après extraction éthérée).*

Jours		A.I.A. donné (3.10^{-4} M/l)					
		E		R		Total	
		mg	%	mg	%	mg	%
non ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	22	47,3	24	51,6	46	99
	15	20,5	44	25	53,8	45,5	97,8
ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	22	47,3	24	51,6	46	99
	15	19,5	42	24	51,6	43,5	93,5

TABLEAU 2 *bis*

Expression chromatographique des divers indols contenus dans l'extrait éthéré (E) et dans la gélose après extraction éthérée (R) en % de la quantité initiale d'A.I.A. exogène introduite dans le milieu de base lorsque N. galligena *est ensemencé.*

			Substances chromatographiées	
			A.I.A.	Autres composés indoliques
Milieu de base + 3.10^{-4} M/l d'A.I.A.	0	E	51	0
		R	49	0
	15e jour	E	42	0
		R	53	0

b) *A.I.A. restant dans le milieu gélosé après extraction éthérée.*

La quantité d'A.I.A. restant dans la gélose demeure pratiquement constante. Le tableau 2 *bis* fait apparaître que l'on trouve environ 50 % de la dose initialement introduite dans le milieu de base.

Il semble donc que *lorsque* N. galligena *pousse sur le milieu de* Westergaard et Mitchell *modifié, il ne se produit qu'une faible inactivation de l'auxine exogène.*

Cas de *R. nigricans.*

a) *A.I.A. contenu dans la fraction éthérée.*

Les dosages colorimétriques et l'analyse chromatographique ont lieu, là aussi, tous les jours jusqu'au 11e jour, puis au 13e et au 15e jour. Aucun fait nouveau ne se manifeste jusqu'au 8e jour pour les milieux ensemencés.

— au 8e jour de croissance, la quantité d'A.I.A. dosée est identique à celle trouvée au bout de 8 jours dans les tubes non ensemencés (tableau 3 et figure 4);

— après 15 jours, la quantité dosée dans la fraction éthérée des milieux non ensemencés subit une diminution. Par contre, à cette même date, la teneur en auxine de l'extrait éthéré des milieux ensemencés est augmentée. Elle est parfois même supérieure à celle synthétisée par le champignon poussant sur milieu témoin; je trouve par exemple environ 26 mg d'A.I.A. représentant 56 % de la dose initialement présente dans le milieu (figure 4);

— les recherches chromatographiques indiquent, en plus de l'A.I.A., du tryptophane et de l'acide β-indolyl-propionique, présents dans les mêmes proportions que lorsque le champignon croît sur milieu témoin (tableau 3 *bis*).

TABLEAU 3

Quantité de composés indoliques (exprimée en mg/l d'A.I.A. et en % (100 = quantité initiale d'A.I.A. exogène après stérilisation), présente dans le milieu de base lorsque R. nigricans *a été ou non ensemencé (E : dans l'extrait éthéré; R : quantité restant dans la gélose après extraction éthérée).*

Jours		A.I.A. donné (3.10^{-4} M/l)					
		E		R		Total	
		mg	%	mg	%	mg	%
non ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	22	47,3	24	51,6	46	99
	15	20,5	44	25	53,8	45,5	97,8
ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	15	26	56	24	51,6	50	107,6

TABLEAU 3 *bis*

Proportions relatives des divers indols (100 : indols totaux contenus dans le milieu de base); (E) extrait éthéré; (R) indols restant dans le milieu gélosé après extraction éthérée lorsque R. nigricans *a été ensemencé.*

			Substances chromatographiées		
			A.I.A.	Ac. β-indolyl-propionique	Tryptophane
Milieu de base	0	E			
		R			
	15e jour	E	45	+	+
		R	40	+	+
Milieu de base + 3.10^{-4} M/l d'A.I.A.	0	E	50	0	0
		R	48	0	0
	15e jour	E	53	+	+
		R	48	+	+

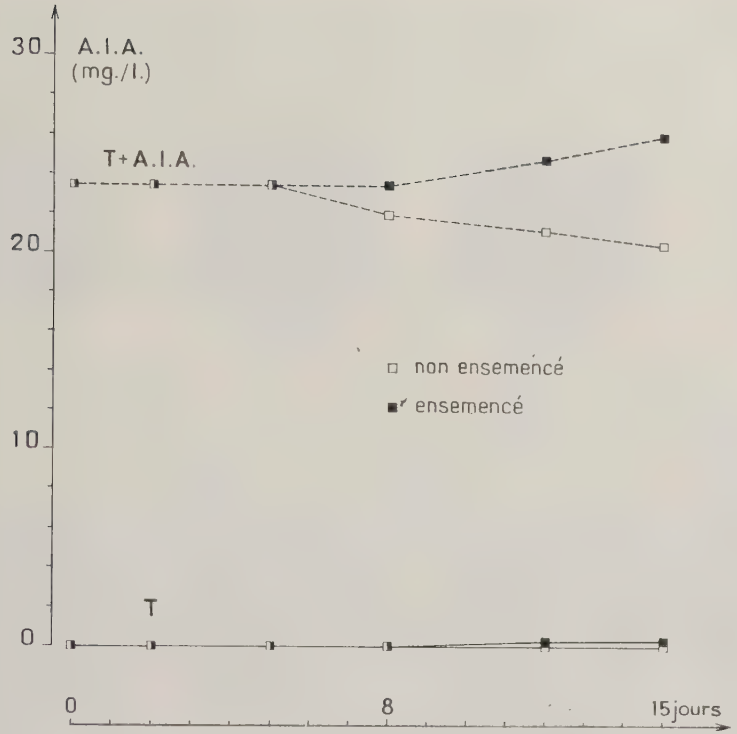


FIGURE 4

Evolution, en fonction du temps, de la quantité d'A.I.A. extraite par l'éther du milieu de base additionné ou non d'A.I.A. exogène lorsque R. nigricans *y est ensemencé.*

b) *A.I.A. restant dans le milieu gélosé après extraction éthérée.*

L'analyse chromatographique a permis de trouver que des quantités importantes de composés indoliques restent dans le milieu gélosé. En plus de l'A.I.A. qui constitue la majeure partie de ces composés, le tryptophane, l'acide β-indolyl-propionique, ont été aussi décelés (tableau 3 *bis*).

Il en ressort que *R. nigricans,* cultivé sur milieu de Westergaard et Mitchell modifié, ne dégrade pas l'auxine. L'A.I.A. qui a été fourni en excès au champignon, non seulement n'a pas été détruit, mais n'a pas dû être utilisé massivement dans ses synthèses puisqu'il est resté pratiquement tel quel dans le milieu de culture.

Ainsi, dans les conditions d'expérience, les capacités d'inactivation enzymatique ou autres d'A.I.A. par *R. nigricans* et *N. galligena* cultivés isolément, sont faibles ou nulles. Il apparaît donc que les deux organismes choisis pour étudier l'interaction en présence d'A.I.A. synthétisent cette substance; de plus, leur capacité de

destruction de l'hormone végétale est vraiment négligeable et pourtant les deux organismes présentent, quant à leur croissance, un comportement entièrement différent vis-à-vis des fortes doses d'auxine. En effet l'organisme qui, à la rigueur, serait capable de provoquer une très faible inactivation de l'A.I.A. exogène est précisément *N. galligena* et non *R. nigricans*. Pourtant c'est ce dernier qui supporte sans inconvénient des doses considérables d'A.I.A. exogène.

II. — MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION EN CULTURES SIMULTANEES

Il a été montré que *N. galligena*, poussant sur milieu synthétique gélosé contenant A.I.A. a sa croissance inhibée à partir de $1{,}5.10^{-5}$ M/l. Au contraire, *R. nigricans*, cultivé sur le même milieu contenant $1{,}5.10^{-5}$ à 6.10^{-4} M/l d'A.I.A., n'a pas sa croissance inhibée. En outre, les expériences préliminaires concernant les capacités synthétiques en A.I.A. ou les réactions engendrant les inactivations de l'A.I.A. étant succinctement décrites, il importait d'établir alors, avec précision, les interactions de croissance de *N. galligena* et *R. nigricans*, cultivés sur un même substratum dépourvu d'A.I.A. ou en présence de doses croissantes de cette auxine.

Les deux champignons sont ensemencés en même temps et côte à côte dans des boîtes de Petri contenant le milieu de base gélosé additionné ou non de $1{,}5.10^{-5}$ à $1{,}2.10^{-3}$ M/l d'A.I.A.

Sur milieu témoin, la croissance linéaire et pondérale de *N. galligena* comme de *R. nigricans*, est semblable à celle des cultures poussant isolément. *R. nigricans*, qui a une bien plus grande vitesse de croissance linéaire, envahit au 8^{e} jour toute la surface disponible et ses filaments courent même sur ceux de *N. galligena;* il a alors formé ses fructifications.

En présence d'A.I.A., R. nigricans lève entièrement l'inhibition de croissance de *N. galligena*. Le phénomène s'observe à partir du 6^{e} jour et *R. nigricans* n'a pas à cette époque occupé toute la surface du milieu; la levée d'inhibition de *N. galligena* atteint son maximum au 8^{e} jour de croissance. Les données essentielles consignées dans la figure 5 et le tableau 4 illustrent cette interaction. On remarque que, en présence d'A.I.A. et de *R. nigricans*, *N. galligena* couvre une surface comparable à celle qu'il occupe en poussant seul sur milieu témoin et son aspect est semblable à celui des cultures témoins. *R. nigricans* a envahi toute la surface disponible et couvert les filaments de *N. galligena*. Si l'on étudie la croissance pondérale au cours de cette interaction des deux champignons, on peut noter que les poids en matière sèche chez *N. galligena* sont non seulement égaux à ceux du témoin, mais présentent même une certaine augmentation aux doses les plus fortes d'A.I.A.; *R. nigricans* ne subit lui, strictement aucune variation, qu'il pousse seul

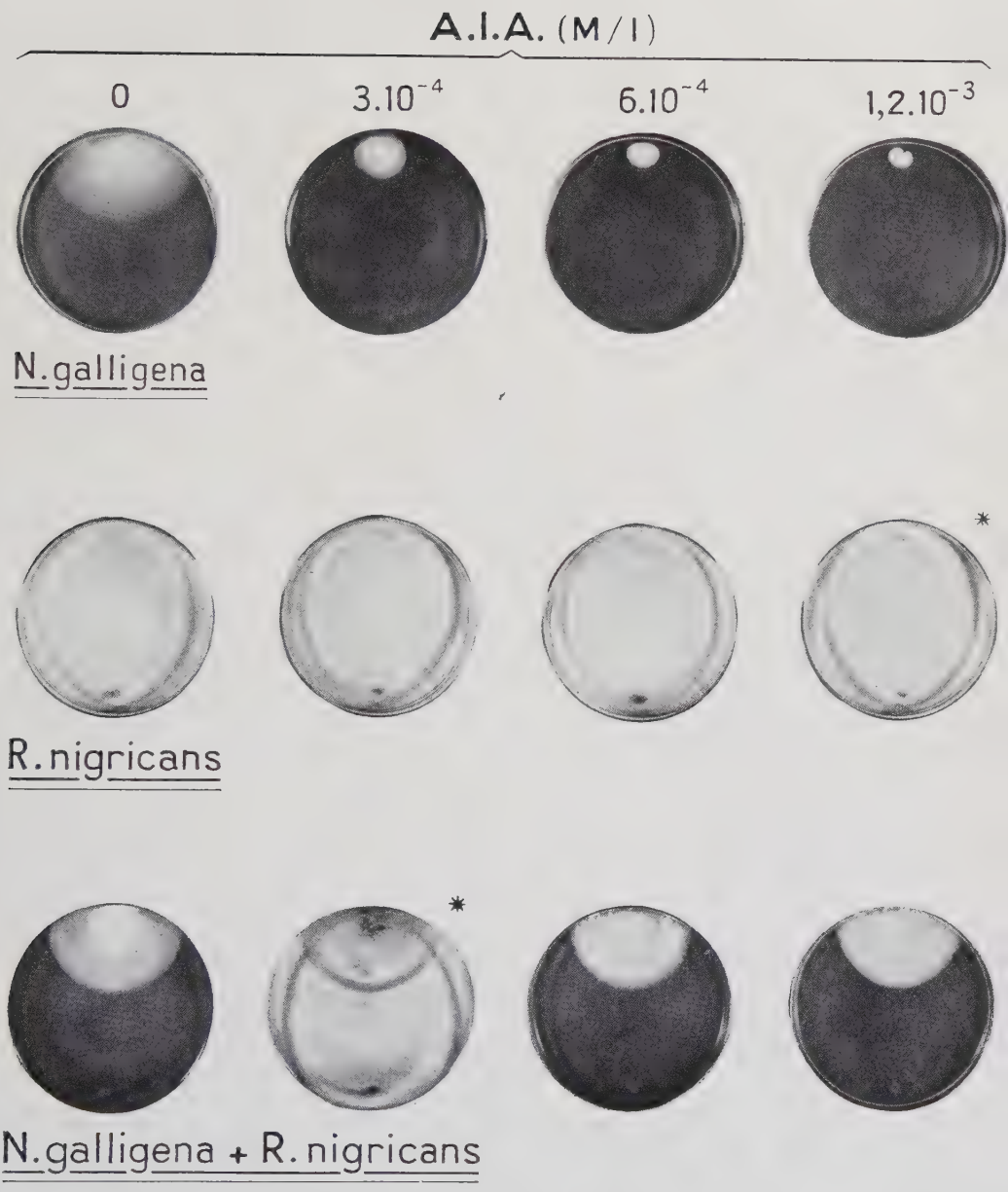


FIGURE 5

Croissance de N. galligena *et de* R. nigricans, *cultivés isolément, ou bien côte à côte* (N. galligena + R. nigricans), *sur milieu de base additionné ou non d'A.I.A., au* 15e *jour après l'ensemencement.*

* Photos prises sur fond blanc, pour laisser apparaître les sporangiophores de *R. nigricans.*

ou en interaction. Les résultats concernant la croissance pondérale des cultures confirment donc les observations effectuées à partir de la croissance en surface.

— J'ai aussi ensemencé *R. nigricans* dans des récipients où *N. galligena* avait, depuis dix jours, sa croissance inhibée par de fortes doses d'auxine. Huit jours environ après l'inoculation de *R. nigricans*, les cultures de *N. galligena* commencent à se développer (poids sec de *N. galligena*, inhibé par 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. : 12 mg; avec l'inoculation de *R. nigricans* : 20 mg) et tendent à rejoindre le témoin (poids sec : 28 mg) par leur aspect et leur poids.

TABLEAU 4

Croissance de deux champignons (poids sec en mg) cultivés seuls ou côte à côte (ensemencements diamétralement opposés) dans des boîtes de Petri de 110 mm de diamètre, contenant le milieu de base avec ou sans A.I.A., au 15e jour après l'ensemencement.

A.I.A. M/l	CROISSANCE							
	N. galligena seul		*R. nigricans* seul		*N. galligena* dans l'interaction *N. galligena* + *R. nigricans*		*R. nigricans* dans l'interaction *N. galligena* + *R. nigricans*	
	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)
0	26,3	2 850	3,9	9 500	26,5	2 960	3,9	9 500
3.10^{-4}	9,2	490	4	id.	38	2 300	4	id.
6.10^{-4}	7,3	190	4	id.	41	2 100	3,9	id.
$1,2.10^{-3}$	5	60	3,9	id.	46,5	2 200	3,9	id.

Il résulte de cet ensemble de faits que :

1° sur milieu témoin et dans les limites de l'expérimentation, la croissance de *N. galligena*, comme celle de *R. nigricans*, n'est pas perturbée par la présence de l'autre champignon.

2° mais surtout, étant donné la composition très simple du milieu témoin d'une part, et le très faible ou nul pouvoir de destruction de l'auxine de chacun des deux organismes cultivés isolément d'autre part, l'interaction ainsi mise en évidence en présence d'A.I.A. peut s'expliquer, en première hypothèse, par la synthèse et la sécrétion par *R. nigricans* d'une ou de plusieurs substances agissant comme des antagonistes des doses inhibitrices de l'A.I.A. chez *N. galligena*, sans destruction de cette auxine. C'est ce problème que nous allons examiner maintenant.

III. — RECHERCHE DES FACTEURS ACTIFS DE *R. NIGRICANS*

Les faits précités impliquaient la recherche de corps antagonistes de l'action inhibitrice de l'auxine, soit dans le milieu de culture, soit dans les filaments de *R. nigricans*. J'étudierai ainsi successivement l'activité antiauxinique, d'une part du milieu de culture de *R. nigricans*, d'autre part des extraits de ses filaments. J'essaierai ensuite de caractériser certains corps synthétisés et sécrétés par le champignon, responsables de la levée d'inhibition chez *N. galligena*.

A. — ACTIVITE DU MILIEU DE CULTURE

J'ai cherché si l'activité antiauxinique du milieu de culture de *R. nigricans* est ou non directement en rapport avec sa concentration et quel est l'effet de la chaleur sur cette activité. En conséquence, *R. nigricans* est cultivé pendant sept jours dans le milieu liquide de WESTERGAARD et MITCHELL modifié. Ce milieu est ensuite stérilisé par filtration sur bougies Chamberland 5 L 3.

1° *Dans une première étape*, le type suivant d'expérimentation est réalisé :

dans certaines séries, je mets 22 ml de ce filtrat brut stérile (correspondant à la quantité moyenne restante du milieu où s'est développée pendant 7 jours une culture de *R. nigricans*) par erlenmeyer stérile, où j'ai au préalable introduit, de façon aseptique, 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. et 8 ml d'eau gélosée stérile à 52 g/l de manière à ce que la concentration finale en gélose soit de 13 g/l;

dans d'autres séries, le filtrat brut en question est enrichi aseptiquement par les sels et le glucose du milieu de WESTERGAARD et MITCHELL modifié, puis gélosé et additionné d'A.I.A. comme il est décrit ci-dessus.

dans d'autres séries encore, j'ajoute au filtrat de culture de *R. nigricans* de la gélose et de l'A.I.A., avec ou sans le glucose et les sels du milieu de WESTERGAARD et MITCHELL modifié; après une répartition de 30 ml par erlenmeyer de ce substratum, le tout est stérilisé à 105 °C pendant 20 minutes.

Sur tous ces milieux, la croissance de *N. galligena* est peu ou pas inhibée en présence d'A.I.A. (tableau 5 et figure 6). On note bien sûr un développement comparativement plus faible du champignon lorsqu'il reçoit seulement le filtrat du milieu de culture de *R. nigricans* en partie épuisé par ce dernier, que si ce filtrat est enrichi des sels et du glucose du milieu témoin. Mais retenons surtout que *l'apport de filtrat du milieu où s'est développée une culture de* R. nigricans *suffit pour lever l'inhibition de croissance due à l'A.I.A. chez une culture* de N. galligena. Il faut remarquer aussi qu'aucune différence n'est trouvée pour la croissance de *N. galligena*, que les expériences aient été réalisées avec un filtrat stérilisé à froid ou à chaud. Les corps à activité antiauxinique sont donc thermostables.

En appendice, je dirai que j'ai également voulu savoir si l'introduction d'A.I.A. (3.10^{-4} M/l) dans le milieu liquide de base fourni à *R. nigricans* peut modifier ou non l'activité antiauxinique de ce milieu. En conséquence, *R. nigricans* est cultivé pendant sept jours sous cette dernière condition; le filtrat gélosé du milieu en question permet ensuite, lui aussi, une bonne croissance de *N. galligena* (tableau 5 [2]).

TABLEAU 5

Croissance pondérale (poids sec) et en surface (dimensions) de N. galligena *ensemencé sur le milieu de culture de* R. nigricans *à qui l'on ajoute de la gélose, les sels et le glucose du milieu de Westergaard et Mitchell modifié (W.M.) et de l'A.I.A. à la concentration de* 3.10^{-4} *M/l.*

TRAITEMENT	GELOSE (13 g/l) +					
	Eau sans apport de milieu ou s'est développé *R. nigricans*		Milieu liquide où s'est développé *R. nigricans* filtré ensuite sur bougie Chamberland (2)			
			Introduit à *froid* dans le substratum (1)		Stérilisation à 105 °C/20 mn	
	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)
— 0			13	51 × 52	12,6	51 × 52
— A.I.A.			13,6	50 × 52	13,4	52 × 52
— ½ sels + ½ glucose du milieu W.M.	23	65 × 65	37,5	65 × 65	36	66 × 65
— milieu W.M. entier ..	25,5	64 × 64				
— ½ sels + ½ glucose du milieu W.M. + A.I.A.	8,6	34 × 33	36	64 × 64	36,9	63 × 64
— milieu W.M. entier + A.I.A.	10,4	35 × 36	37	62 × 64	37,1	63 × 65

(1) Dans ce cas, la gélose a été additionnée de façon stérile à l'aide d'une solution très concentrée (52 g/l) ayant subi une stérilisation préalable.

(2) Pour comparaison, le poids sec de *N. galligena* poussant sur le filtrat gélosé du milieu liquide contenant l'A.I.A. (3.10^{-4} M/l) où s'était développé *R. nigricans* est de 13,5 mg.

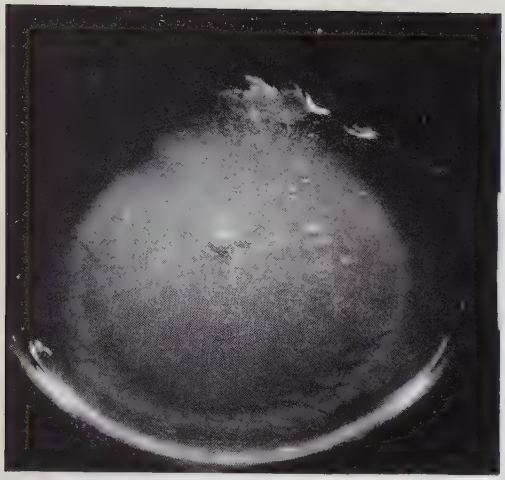
2° *Dans une deuxième étape,* je dessèche sous vide à 40 °C le filtrat brut du milieu de culture témoin de *R. nigricans* et je l'inclus à différentes doses dans le milieu de base gélosé, additionné ou non d'A.I.A. (3.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l). Puis une stérilisation a lieu à 105 °C pendant 20 minutes et *N. galligena* est alors ensemencé.

Le tableau 5 *bis* et les photos de la figure 7 illustrent l'essentiel de ces données. Notons principalement que 4,3 mg de filtrat de milieu de culture de *R. nigricans* est capable de renverser l'action inhibitrice de 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. Mais cette concentration de filtrat

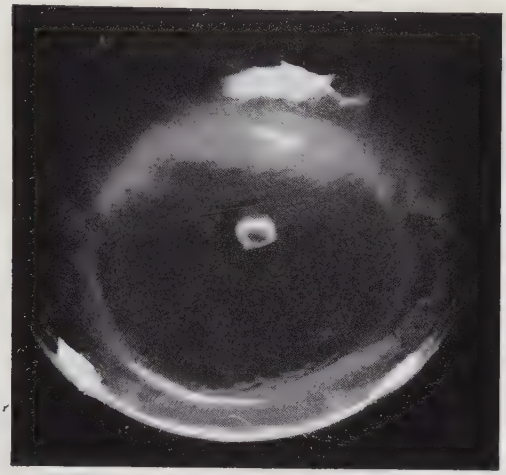
TABLEAU 5 *bis*

Croissance pondérale (poids sec : P.S.) et en surface (dimensions : Dim.) de N. galligena *au 15e jour de culture, sur milieu de base contenant ou non A.I.A. avec ou sans* filtrat stérilisé du milieu *sur lequel s'est développé* R. nigricans.

A.I.A. (M/l)	Filtrat du milieu sur lequel s'est développé *Rhizopus nigricans* (en mg de matière sèche/l)											
	0		0,6		4,3		8,7		17,4		87,2	
	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)
0	24	40 × 20	24,1	40 × 20	30,1	40 × 20	31	40 × 20	30,9	40 × 20	37,5	42 × 20
3.10^{-4}	8	9 × 13	22	36 × 20	22,1	36 × 20	22	37 × 20	31,6	40 × 20	42,5	42 × 20
6.10^{-4}	7,2	8 × 8	22	36 × 20	22,9	36 × 20	23,6	37 × 20	32,6	40 × 20	40	42 × 20
$1,5.10^{-3}$	4	3 × 3			22,4	34 × 20	22,5	36 × 20	30	40 × 20	39,5	42 × 20

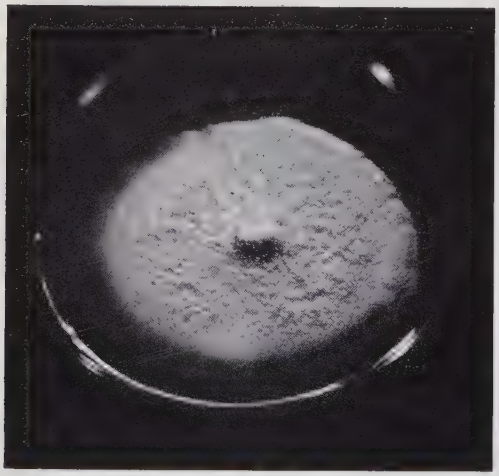


I



II

III



IV

FIGURE 6

Cultures âgées de 20 *jours de* N. galligena *développées sur :*

I : milieu de base (T).

II : T + A.I.A. (3.10^{-4} *M/l*) ; *la culture est située uniquement au centre.*

III : sels, glucose et gélose du milieu T + filtrat du milieu où s'est développée une culture de R. nigricans.

IV : substratum III + A.I.A. (3.10^{-4} *M/l*).

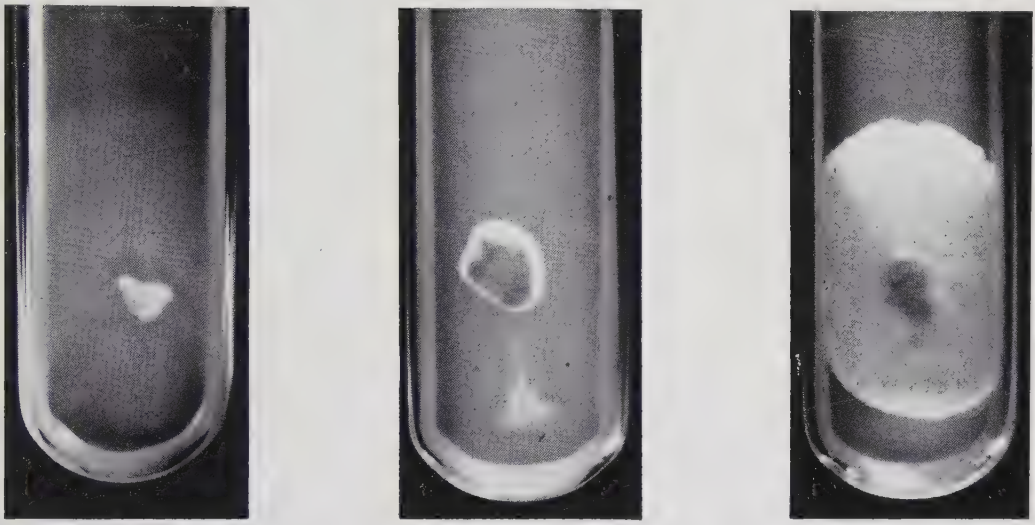


FIGURE 7

Action de 4,3 *mg/l du filtrat de culture de* R. nigricans (*S*) *sur la levée de l'inhibition de croissance de* N. galligena, *provoquée par* 3.10^{-4} *M/l d'A.I.A.* (*âge des cultures :* 15 *jours*).

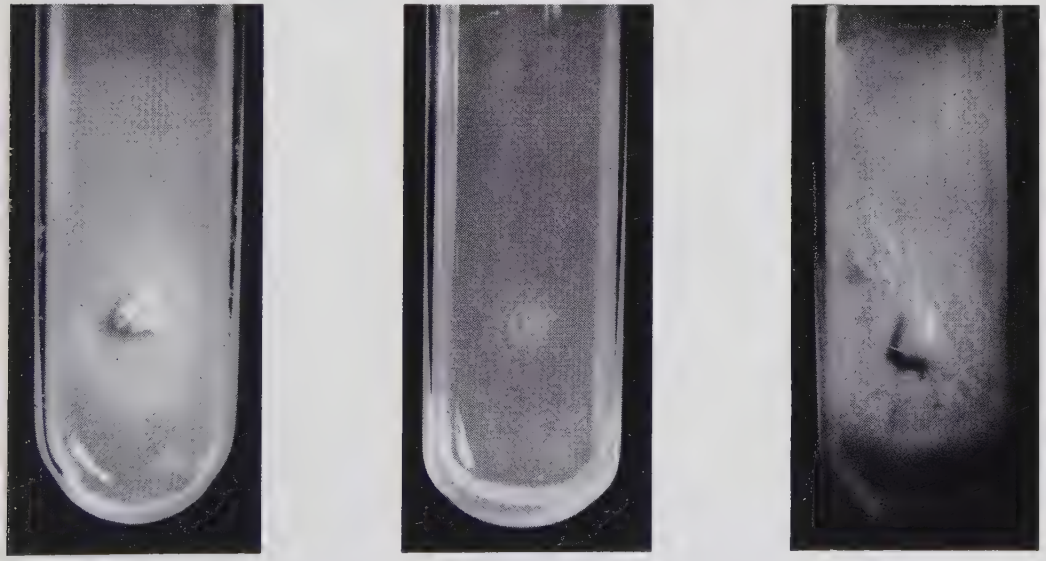


FIGURE 8

Action de l'extrait hydrosoluble de filaments de R. nigricans (*E*) *sur la levée de l'inhibition de croissance de* N. galligena *provoquée par* 3.10^{-4} *M/l d'A.I.A.* (*âge des cultures :* 15 *jours*).

TABLEAU 6

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant ou non A.I.A. et avec ou sans extrait de filaments de* R. nigricans *(âge des cultures : 15 jours).*

A.I.A. (M/l)	Extrait des filaments de 50 cultures de *R. nigricans* ajouté dans un litre de milieu de base			
	0	Fraction A, hydrosoluble	Fraction B, alcoolique	Fraction C (A + B)
0	20	30	31	33
$1{,}5.10^{-4}$	9	32	32	31
3.10^{-4}	6,6	32	31	32
3.10^{-3}	2	25	24	26

TABLEAU 6 *bis*

Croissance pondérale (poids sec en mg : P.S.) et en surface (dimensions : Dim.) de N. galligena, *cultivé en présence ou non d'A.I.A. et avec ou sans l'extrait hydrosoluble de* filaments de R. nigricans *(âge des cultures* : 15 *jours).*

A.I.A. (M/l)	Extrait hydrosoluble de filaments de *Rhizopus nigricans* (en mg de matière sèche/l)											
	0		0,24		14		28		56		180	
	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)	P.S. (mg)	Dim. (mm)
0	20	38 × 20	20	38 × 20	22,5	38 × 20	25,7	38 × 20	28	38 × 20	35	40 × 20
$3{,}75.10^{-5}$	13	25 × 16	20	36 × 20	24	36 × 20	26	37 × 20		37 × 20		40 × 20
$7{,}5.10^{-5}$	11	20 × 16	20	36 × 20	20	36 × 20	19	37 × 20		37 × 20		40 × 20
$1{,}5.10^{-4}$	9	15 × 16	20,5	36 × 20	20	35 × 20	18	35 × 20	21	36 × 20		40 × 20
3.10^{-4}	6,6	10 × 13	18,1	33 × 20	18	33 × 20	20,6	35 × 20	17,6	33 × 20		40 × 20
6.10^{-4}	6	8 × 8									34	40 × 20
$1{,}5.10^{-3}$	3,6	3 × 3									27	15 × 20
3.10^{-3}	2	1 × 1									24,6	15 × 20

présente l'inconvénient de produire souvent une accélération de la croissance de *N. galligena* sur milieu témoin. La dose qui semble la plus intéressante en tenant compte des variations pouvant se produire d'une expérience à l'autre, est de 0,6 mg/l. Enfin, l'antagonisme qui vient d'être décrit est de type non compétitif puisque, dans la majorité des cas, n'importe quelle dose de filtrat sec $\geqslant$ 0,6 mg/l, lève, de la même manière, l'inhibition provoquée par n'importe quelle dose d'A.I.A. comprise entre 3.10^{-4} et $1{,}5.10^{-3}$ M/l.

B. — ACTIVITE DE L'EXTRAIT DE FILAMENTS

R. nigricans est cultivé sur milieu liquide de Westergaard et Mitchell modifié pendant sept jours. Les filaments sont alors retirés, lavés à l'eau bidistillée, et séchés succinctement entre des feuilles de papier filtre. Ils sont ensuite stérilisés à 100 °C pendant 30 minutes, dans une quantité d'eau bidistillée équivalente à celle du milieu où ils se sont développés; après avoir retiré les filaments, l'extrait aqueux obtenu est filtré sur bougies Chamberland 5 L 3 et séché sous vide à 40 °C. Il constitue la fraction A. Puis, ces mêmes filaments sont fixés pendant 15 minutes dans l'alcool à 70° bouillant avec un système à reflux et broyés ensuite finement. Les broyats sont alors à nouveau repris dans l'alcool bouillant pendant 20 minutes. Les solutions alcooliques sont enfin additionnées et séchées sous vide à 40 °C, pour constituer la fraction alcoolique B. Ces fractions A et B, expérimentées seules ou en combinaison dans la fraction C (C = A + B), au sujet de leur activité antiauxinique sur la croissance de *N. galligena*, sont alors introduites dans le milieu de base habituel contenant des doses croissantes d'A.I.A. Les essais effectués avec les fractions A, B et C donnent des résultats identiques dans la majorité des cas (tableau 6). Aussi dans la suite de l'expérimentation, seule la fraction A, hydrosoluble, est-elle utilisée. Des quantités croissantes d'extrait sec hydrosoluble des filaments de *R. nigricans* sont fournies en même temps que l'A.I.A. au milieu de base où est ensemencé *N. galligena*. Le tableau 6 *bis* et la figure 8 résument l'essentiel de ces résultats.

On peut retenir que de faibles quantités d'extrait (0,24 mg/l) lèvent l'inhibition de *N. galligena* et que de plus fortes concentrations d'extrait produisent en plus de fortes accélérations de croissance. N'importe quelle dose d'extrait est capable de lever l'inhibition provoquée par des doses croissantes d'A.I.A. (0,3 à 3.10^{-4} M/l). Il s'agit là d'un antagonisme de type non compétitif.

Il semble donc que l'étude concernant l'activité antiauxinique de *R. nigricans* permette de dire que :

— *R. nigricans* synthétise dans ses filaments et excrète dans son milieu des substances thermostables, solubles dans l'eau et l'alcool, agissant comme de véritables substances antiauxiniques, sur la croissance inhibée par l'A.I.A. de *N. galligena*.

— de faibles quantités du milieu sur lequel s'est développé *R. nigricans* ou d'extraits de ses filaments, renversent l'action inhibitrice de l'auxine chez *N. galligena*.

— cet antagonisme n'est pas de type compétitif.

C. — ESSAIS DE DETERMINATION DE CERTAINS CORPS RESPONSABLES DE LA LEVEE D'INHIBITION CHEZ *N. GALLIGENA*

Nous venons de voir que les facteurs de *R. nigricans* sont certainement actifs à très faibles doses. Or, les expériences de Nysterakis (1954 b) ont montré que 0,1 mg/l de biotine lève entièrement l'action inhibitrice de doses élevées d'auxine sur *N. galligena*. Par ailleurs, on sait que de nombreuses Mucorinées telles que *Rhizopus suinus* sont auxoautotrophes pour la biotine. Cette substance, formée intensément dans la phase juvénile de développement du champignon précité, diffuse en grande partie dans le milieu de culture où elle s'accumule (Schopfer, 1942 et 1945). Chez *R. nigricans*, l'activité bios avec le test *Saccharomyces cerevisiæ* décelée par von Euler et Philipson (1932) indiquait déjà la synthèse probable de la biotine. La recherche de cette vitamine dans le milieu de culture de *R. nigricans* s'imposait donc en premier lieu.

La biotine a été identifiée tout d'abord par dosage bactériologique à l'aide de *Lactobacillus arabinosus* 17-5 et de *Streptococcus fæcalis liquefaciens* 30 022 γ (Gr.D) sur les filtrats de milieux de culture de *R. nigricans* suivant la méthode de Wright et Skeggs (1944). La figure 9 montre la croissance de *L. arabinosus* en fonction de concentrations croissantes de biotine pure (0,00001 à 0,02 mg/l). Sur cette même figure sont inscrites les valeurs de croissance du *Lactobacillus* produites par des concentrations croissantes du milieu où s'est développé *R. nigricans*. Le champignon synthétise la biotine en quantités importantes, environ 250 µg/l.

J'ai tenu à extraire ce corps du milieu de culture de *R. nigricans* et à éprouver son activité antiauxinique sur *N. galligena*. Kögl et Tönnis (1936) ont eu le grand mérite d'isoler, les premiers, la biotine cristallisée sous forme de methyl ester. Ils procédaient en seize étapes principales dont l'une par adsorption sur charbon animal. A partir de 250 kg d'œufs frais de cane (variété canard chinois), ils obtenaient 1,1 mg de biotine, soit 1,8 % de la quantité initiale. Je me suis alors inspirée de cette méthode dans un premier essai d'isolement chimique.

R. nigricans est cultivé sur milieu de Bach (1). Au 8e jour après l'ensemencement, le filtrat du milieu de culture est recueilli

(1) Je préférais le milieu de Bach à celui de Westergaard et Mitchell modifié car *R. nigricans* présente sous cette condition une croissance très supérieure et ses facultés de synthèse se trouvent considérablemnt accrues.

et traité en vue d'extraire la biotine qui y est contenue. A partir de 4 litres de filtrat, j'obtiens en fin d'opération un sirop épais. Avec les moyens dont je disposais, je n'ai pas réussi à faire cristalliser avec cette méthode le corps actif; mais le dosage à l'aide de *L. arabinosus* ne laisse aucun doute sur les fortes quantités de biotine contenues dans le produit terminal, environ 120 µg/l de milieu initial. De plus, l'activité antiauxinique de ce produit sur *N. galligena* est comparable à celle de la biotine pure commerciale, comme l'indique le tableau 7. Par exemple, la croissance de *N. galligena* sur milieu de base est de 17 mg; cette croissance inhibée par 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. est de 6 mg. Si l'on ajoute au milieu de base contenant l'A.I.A. le produit extrait selon Kögl, la croissance devient égale à 12 mg, celle du champignon recevant alors la biotine pure étant de 18 mg.

Il s'agissait de trouver par conséquent des moyens d'extraction permettant cette fois l'obtention de biotine cristallisée.

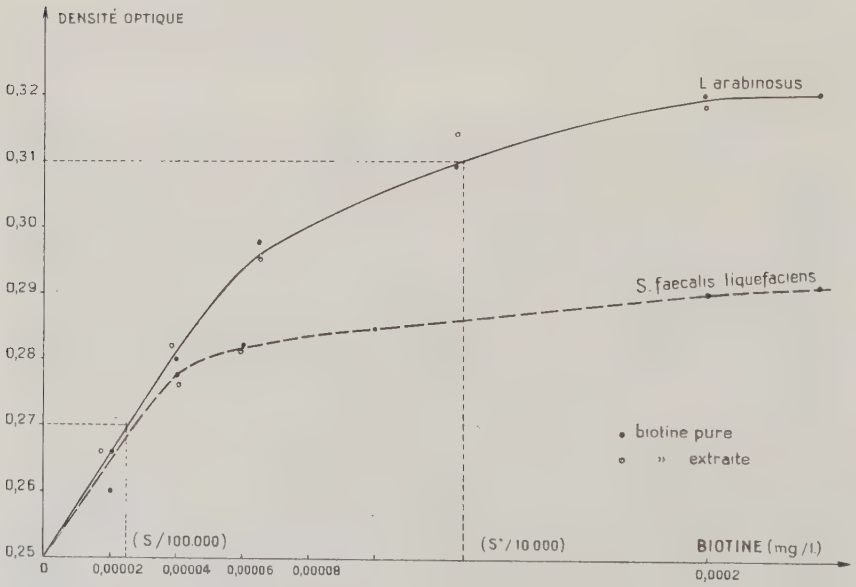


FIGURE 9

Activité biotine du filtrat du milieu de culture de R. nigricans *comparée à celle de la biotine pure sur la croissance de* L. arabinosus *et de* S. faecalis liquefaciens (*exprimée en densité optique*). *S* = 10 *litres de filtrat de milieu de* R. nigricans; *S'* = *concentré obtenu selon le procédé de Kögl.*

TABLEAU 7

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *cultivé sur milieu de base, contenant ou non des doses croissantes d'A.I.A. avec ou sans substance antiauxinique au 15e jour après l'ensemencement.*

A.I.A. (M/l)	MILIEU DE BASE + 0	Milieu brut *R. nigricans* (50 mg/l)	Biotine pure (mg/l) (1) 0,001	Biotine pure (mg/l) (1) 0,1	Biotine pure (mg/l) (1) 1	Biotine non cristallisée, extraite suivant la méthode de KÖGL (0,1 mg/l)	Biotine cristallisée suivant la méthode de DU VIGNEAUD — Cristaux bruts (0,1 mg/l)	Biotine cristallisée suivant la méthode de DU VIGNEAUD — A partir de 0,1 mg de cristaux bruts — Cristaux purifiés/chromatographie	Biotine cristallisée suivant la méthode de DU VIGNEAUD — A partir de 0,1 mg de cristaux bruts — Corps X
0	17,3	37	19,5	19,2	21,5	15,5	25,8	19	18
$1{,}5.10^{-5}$	15,2		19,8	17,5	20,9	15,3	—	—	—
3.10^{-5}	10,3		18,4	18	21	15	25,6	15,8	15,8
6.10^{-5}	8	36	18,6	18,7	21,6	12,5	—	—	—
$1{,}5.10^{-4}$	7,6		18,5	17,6	20,5	15,3	25,5	15,8	12
3.10^{-4}	6	30	18,8	16,8	21,1	12	25,3	15,3	12

(1) 0,1 mg de biotine équivaut à $4{,}09.10^{-7}$ M. Il s'ensuit que 0,001 mg correspond à $4{,}09.10^{-9}$ M et 1 mg à $4{,}09.10^{-6}$ M.

Une des étapes finales du procédé de Kögl et Tönnis est la conversion de la biotine en une base estérifiée par le méthanol et biologiquement active. Du Vigneaud et coll. (1941) et Melville et coll. (1942), extrayant la biotine à partir du foie frais, ont alors estérifié la préparation brute pour obtenir dès le départ un matériel actif, soluble dans les solvants organiques et qui pouvait subir lui-même une purification par des procédés d'adsorption chromatographique sur alumine. Ils ont ainsi obtenu un rendement en biotine bien plus élevé (38 %).

En conséquence, dans un deuxième essai, j'ai utilisé la méthode de du Vigneaud et coll. Huit litres du milieu sur lequel s'est développé pendant 8 jours *R. nigricans* ont été traités. Des cristaux de biotine semblables à ceux décrits par les précédents chercheurs ont été obtenus. Puis, comme dans le cas du produit actif séparé avec la méthode de Kögl, je me suis assurée de la nature de ces cristaux en comparant leur activité biologique à celle d'une solution préparée avec la biotine commerciale (Roche). Il a été démontré que pour la croissance de *L. arabinosus*, l'action de ces cristaux est bien celle de cristaux de biotine.

J'ai comparé ensuite (tableau 7 et figure 10), sur *N. galligena*, la valeur antiauxinique de 0,1 mg/l de biotine extraite à celle de 0,1 mg/l de biotine pure vendue dans le commerce. Dans tous les cas, la biotine extraite lève, comme la biotine commerciale, entièrement l'inhibition de croissance provoquée par $1{,}5.10^{-5}$ à 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. chez *N. galligena*. Enfin, l'antagonisme en question s'est montré pour tous les cas, de type non compétitif. De plus, on note même une accélération de la croissance. Il est donc apparu que la biotine cristallisée présente une activité supérieure à celle de la biotine du commerce. En effet, la croissance de *N. galligena* est de 25,3 mg avec la biotine extraite contre 16,8 mg seulement avec la biotine du commerce, en présence de 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., alors qu'elle est de 17,3 mg dans une culture témoin.

En conséquence, après dissolution dans l'eau des cristaux obtenus, j'ai cherché à vérifier systématiquement si des substances à activité antiauxinique n'ont pas cristallisé en même temps que la biotine. Ces recherches ont été orientées principalement vers les groupes des acides organiques et des acides aminés. En dépit de nombreuses tentatives, aucun acide aminé n'a pu être décelé. Par contre, la chromatographie de partage sur papier des acides organiques utilisant comme solvant ammoniaque-eau (I) et butanol-acide formique-eau (II) a mis en évidence deux taches distinctes. L'une d'elles est due à la biotine (Rg 140-120), l'autre à un corps X qui n'a pu être identifié en raison de sa faible quantité et dont le Rf est voisin de celui de l'acide gallique (Rg 70-95) (1). Ce corps est thermostable, hydrosoluble et possède une fonction acide orga-

(1) Le Rg pour la biotine est de 140 dans le solvant alcalin et de 120 dans le solvant acide; pour l'acide gallique, il est de 70 dans le solvant alcalin et de 95 dans le solvant acide.

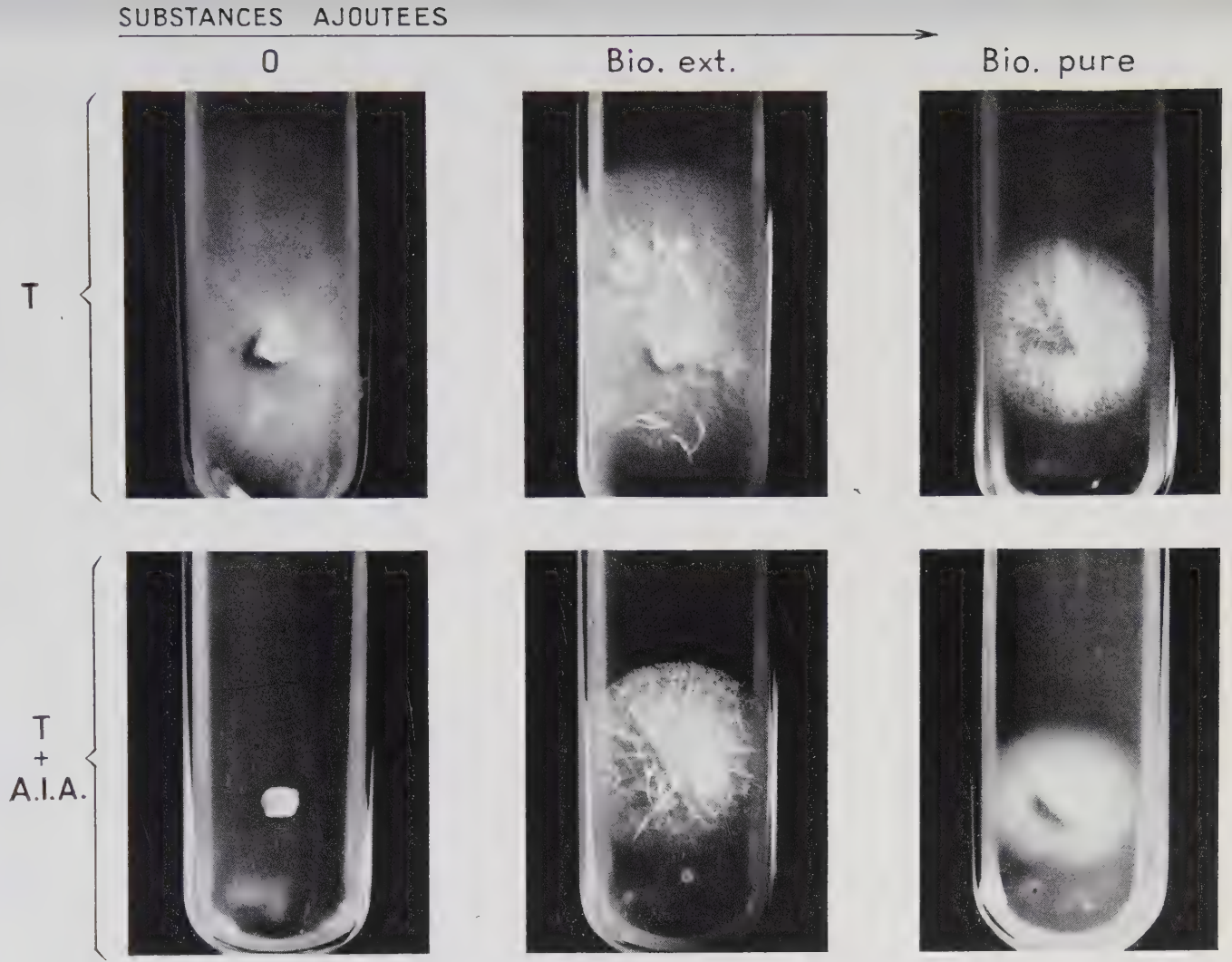


FIGURE 10

Activité antiauxinique sur le test N. galligena *de* 0,1 *mg/l de cristaux bruts de biotine extraite* (*bio. ext.*) *et de* 0,1 *mg/l de biotine pure commerciale* (*bio. pure*).

nique. Si l'on compare l'activité antiauxinique sur *N. galligena* du corps X et de la biotine présents dans 0,1 mg/l de cristaux bruts, on constate que celle de la biotine est supérieure à celle du corps X (figure 11). La croissance de l'organisme inhibé est ici de 34,7 % de la croissance du témoin. En présence d'A.I.A., le corps X produit une croissance de 69,4 % et la biotine purifiée de 88,4 %, soit une restitution de croissance par rapport au témoin de 34,7 % pour le corps X et de 53,7 % pour la biotine purifiée. Or, il n'était pas possible de chiffrer les concentrations respectives des deux corps dans les cristaux bruts de biotine; ces résultats permettent donc seulement d'affirmer que le corps X, comme la biotine, agit à très faibles doses en tant que « métabolite anti-auxine ». En outre, l'antagonisme du corps X est aussi de type non compétitif, comme celui de la biotine purifiée (tableau 7). Enfin, il y aurait lieu de penser que si le milieu de culture de *R. nigricans* renverse l'action inhibitrice de l'auxine chez *N. galligena, principalement* à l'aide du corps X et de la biotine, ces deux substances exercent alors une action à allure synergique (figure 11 et tableau 7). En effet, on remarque par exemple que dans un milieu de base contenant 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., l'apport de cristaux bruts de biotine provoque une croissance égale à 146,2 % de la croissance du témoin, la croissance de l'organisme inhibé étant de

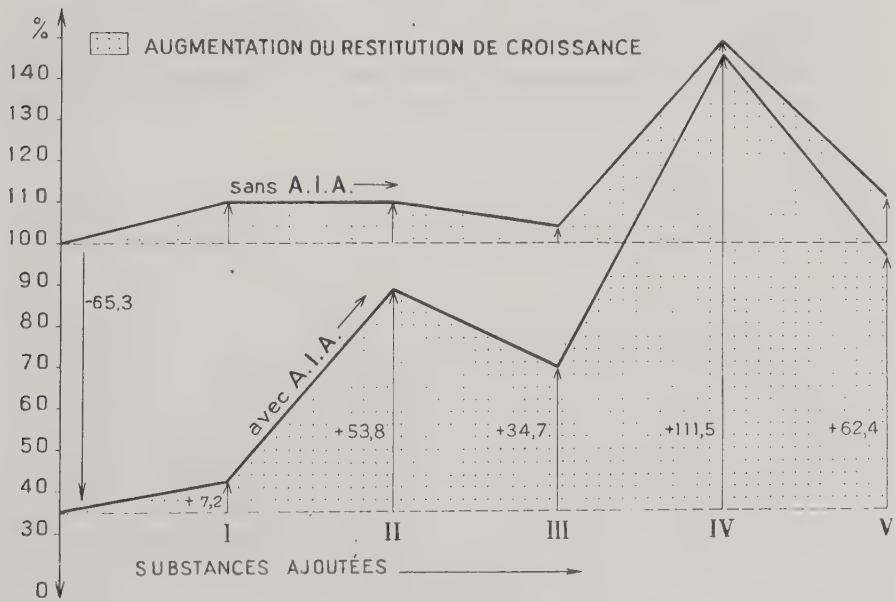


FIGURE 11

Croissance de N. galligena *en pourcentage de la croissance du témoin* (100) *cultivé sur milieu de base; + papier sans tache du chromatogramme : I; + biotine du chromatogramme : II; + corps X du chromatogramme : III; + biotine impure* 0,1 *mg/l : IV; + biotine pure* 0,1 *mg/l : V.*

34,7 %. La restitution de croissance est donc de 111,5 %. Dans les mêmes conditions, la biotine purifiée seule produit une restitution de 53,7 % et le corps X de 34,7 %; si l'on ajoute leurs actions, la restitution de croissance est seulement de 88,4 %.

Bref, l'ensemble des faits exposés dans ces dernières expérimentations prouve que l'inhibition de croissance d'un organisme (N. galligena), *produite par l'A.I.A. peut être annulée à l'aide de métabolites provenant de l'excrétion d'un autre organisme* (R. nigricans) *et identifiés comme étant la biotine et un corps X.*

***

Il apparaît donc que la première interaction étudiée ici s'établit ainsi entre un organisme très résistant à l'action de l'A.I.A. et un autre au contraire si sensible à cette action que sa croissance en est profondément modifiée. En présence d'A.I.A., la culture simultanée des deux champignons, sans nuire en quoi que ce soit à la croissance de *R. nigricans*, permet une bonne croissance de *N. galligena*. L'interaction est justifiable de la synthèse dans les filaments de *R. nigricans* puis de la sécrétion dans le milieu de culture de substances pouvant être classées parmi les « métabolites antiauxines » (1) et qui sont ici identifiées à la biotine et au corps X. Pour différencier cette interaction *R. nigricans — N. galligena*, très caractéristique sur milieu solide, des interactions moins prononcées manifestées par d'autres organismes sous d'autres conditions, je l'ai appelée *interaction de type apparent*.

(1) Les « métabolites antiauxines » seraient des substances qui se comporteraient comme des antagonistes de l'A.I.A. lors de son effet inhibiteur sur la croissance de certains cryptogames.

CHAPITRE II

INTERACTION *FUSARIUM VASINFECTUM - NECTRIA GALLIGENA* EN PRESENCE D'ACIDE β-INDOLYL-ACETIQUE

Ayant déjà étudié les réactions de *N. galligena* en cultures isolées, il m'a paru opportun d'établir ici en premier lieu les capacités de synthèse en auxine de *Fusarium vasinfectum*, sa résistance à l'A.I.A. exogène et son pouvoir éventuel de destruction du même A.I.A. exogène, selon les techniques utilisées pour l'étude des deux premiers champignons.

Comme dans l'analyse de l'interaction *R. nigricans* — *N. galligena*, j'examinerai ensuite l'interaction de croissance en cultures simultanées de *F. vasinfectum* et de *N. galligena;* la nature des facteurs synthétisés par *F. vasinfectum* susceptibles de lever l'inhibition de croissance de *N. galligena* provoquée par l'auxine sera ensuite précisée.

I. — DEVELOPPEMENT DE *F. VASINFECTUM* SUR LE MILIEU DE BASE ADDITIONNE OU NON D'A.I.A. EXOGENE

Fusarium vasinfectum Eck., champignon pathogène causant la flétrissure (wilt) du cotonnier, se développe fort bien sur des substratums synthétiques simples tels que ceux de Richard ou de Czapeck, où sa croissance reste satisfaisante pour une large gamme de pH acides (Bouillenne et Bouillenne-Walrand, 1951; Kalyanasundaram et Lakshminarayanan, 1953). D'après Hirata (1958) il synthétise fort peu d'auxine en présence de nitrates, alors qu'il en forme des quantités importantes en présence de tryptophane. Enfin Bouillenne et Bouillenne-Walrand (1951) ont également montré que les auxines apportées à fortes doses perturbent la croissance du champignon de façon différente selon leur nature; une inhibition assez marquée mais qui disparaît environ au bout de 30 jours, est provoquée par 200 et 1 000 mg/l d'A.I.A. Pour des doses identiques, l'acide β-indolyl-propionique détermine une inhibition très importante et irréversible alors qu'au contraire le dichlorophénoxyacétate de Na ne paraît pas inhibiteur.

Dans mes propres essais, j'ai d'abord constaté que le milieu de WESTERGAARD et MITCHELL modifié, utilisé dans l'interaction *R. nigricans — N. galligena,* convient parfaitement au développement de *F. vasinfectum* (tableau 8). Puis j'ai recherché si sur ce milieu, *Fusarium* forme des composés indoliques. Pour cela, j'ai suivi la même méthode que dans le cas de *N. galligena* et *R. nigricans.*

TABLEAU 8

Croissance pondérale (poids sec en mg, moyenne de 6 cultures) de Fusarium vasinfectum *sur milieu de base additionné ou non d'A.I.A. (âge des cultures : 15 jours).*

Jours après l'ensemencement	CROISSANCE — A.I.A. (M/l) 0	6.10^{-5}	$1,5.10^{-4}$	3.10^{-4}	6.10^{-4}
0	0	0	0	0	0
8	32	33	32,2	33	32,8
15	48,6	48	48,5	48,3	48,5
30	60,5	60,9	61,3	64	64,3

J'ai effectué :

— *en premier lieu* des dosages colorimétriques d'*A.I.A. extrait par l'éther* du milieu de base gélosé où pousse *F. vasinfectum* (figure 12). Une chromatographie de partage sur papier avait lieu simultanément sur cet extrait éthéré. C'est seulement au bout de 15 jours de croissance que la présence de composés indols est décelée en faibles quantités. La majeure partie est constituée par de l'A.I.A. mais on trouve aussi un peu de tryptophane et d'acide β-indolyl-propionique (tableau 9).

TABLEAU 9

Proportions relatives des divers indols présents dans le milieu où s'est développé F. vasinfectum. *100 = indols totaux contenus dans le milieu de culture; (E) dans l'extrait éthéré; (R) restant dans la gélose après extraction éthérée.*

			% de l'ensemble des substances indoliques chromatographiées		
			A.I.A.	Acide β-Indolyl-propionique	Tryptophane
Milieu de base	0	E	0	0	0
		R	0	0	0
	15e jour	E	47	+	+
		R	45	+	+
Milieu de base + 3.10^{-4} M/l A.I.A.	0	E	49	0	0
		R	51	0	0
	15e jour	E	18	traces	+
		R	75	+	+

— *en deuxième lieu, l'analyse chromatographique du milieu gélosé après extraction de l'A.I.A. soluble dans l'éther* n'a montré des composés indoliques qu'au 15e jour de croissance seulement, en quantités équivalentes à celles qui sont extraites par l'éther (45 %). Il s'agit ici aussi principalement d'A.I.A. et de traces de tryptophane et d'acide β-indolyl-propionique (tableau 9). Conformément aux résultats de Hirata (1958), la souche de *F. vasinfectum* utilisée synthétise donc divers composés indoliques, constitués surtout par de l'A.I.A. et décelables à partir du 15e jour.

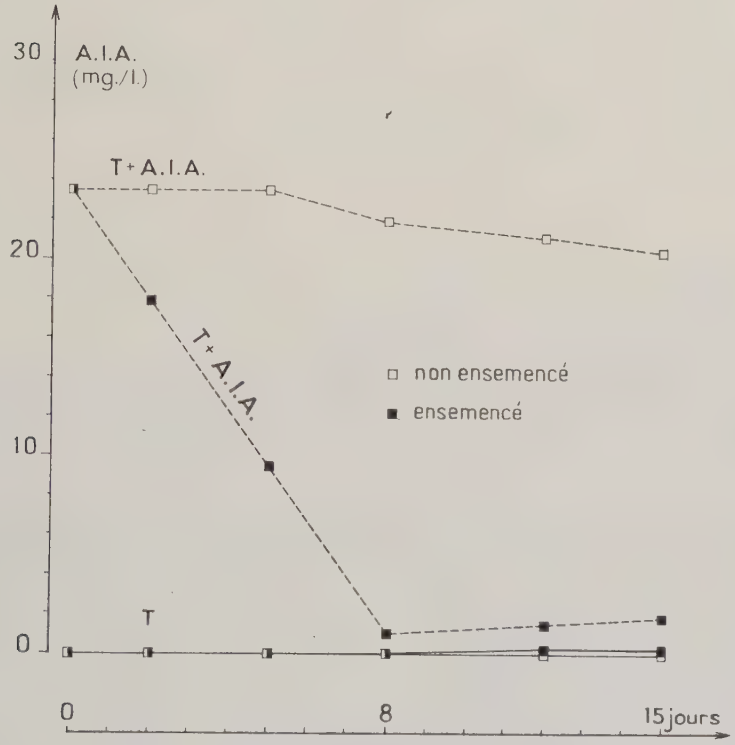


FIGURE 12

Evolution, en fonction du temps, de la quantité de composés indoliques (exprimée en mg/l d'A.I.A.) extraite par l'éther du milieu de base seul (T) ou additionné de 3.10^{-4} *M/l d'A.I.A. (T + A.I.A.) lorsque* F. vasinfectum *y a été ou non ensemencé.*

J'ai cherché alors à connaître quelle est la résistance de *F. vasinfectum* à de fortes doses d'auxine exogène. En présence d'A.I.A. apporté dans le milieu de base aux doses comprises entre $1{,}5.10^{-5}$ et 6.10^{-4} M/l, le champignon n'a pas sa croissance inhibée par rapport à celle des cultures témoins, comme l'indiquent le tableau 8 et la figure 13. Dans ces limites de concentrations

F. vasinfectum est, comme *R. nigricans*, résistant à de fortes doses d'auxine exogène.

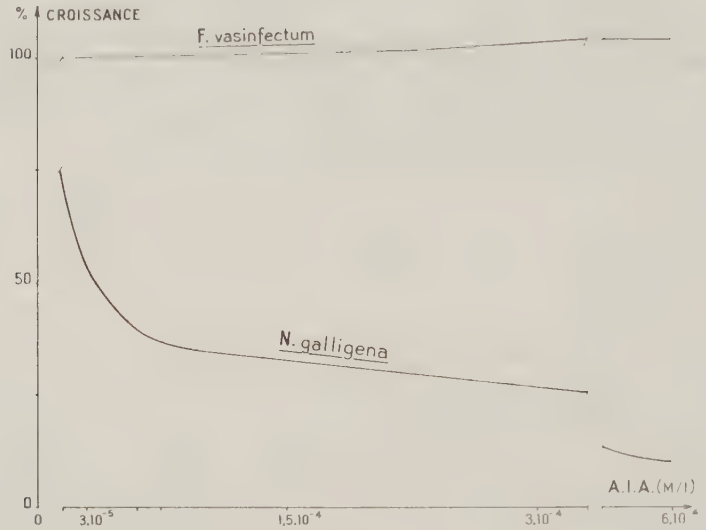


FIGURE 13

Croissance de F. vasinfectum *(en pour cent de la croissance du témoin = 100) cultivé pendant 15 jours sur milieu de base additionné de doses croissantes d'A.I.A. Pour comparaison, croissance de* N. galligena *sur le même substratum.*

Examinons maintenant le devenir de l'A.I.A. apporté dans le milieu sur lequel se développe Fusarium. Pour cela, comme dans les expériences avec *N. galligena* et *R. nigricans*, j'ai dosé colorimétriquement, tout au long de la croissance, l'A.I.A. extrait par l'éther du milieu gélosé; j'ai vérifié chromatographiquement sa nature et si d'autres composés indoliques ont été dosés en même temps. Puis l'A.I.A., restant dans le milieu gélosé après extraction éthérée, a été évalué à partir des taches chromatographiées.

a) *A.I.A. contenu dans la fraction éthérée.* — Les dosages colorimétriques montrent que l'éther permet d'extraire du milieu de culture environ 50 % de la quantité initiale d'A.I.A. le jour de l'ensemencement, dans les séries ensemencées comme dans celles qui ne le sont pas. Au 8e jour de croissance, la quantité d'A.I.A. extraite par l'éther dans les séries ensemencées n'est plus que de 2,2 % tandis que dans les séries non ensemencées, elle atteint toujours des pourcentages de l'ordre de 47 %. Au 15e jour, cette diminution de la quantité d'A.I.A. dosée ne s'est pas accentuée. On note même au contraire une légère augmentation, augmentation qui pourrait être en relation avec le pouvoir de synthèse en A.I.A. de *F. vasinfectum*. La figure 12 et le tableau 9 *bis* résument les résultats obtenus lorsque *F. vasinfectum* est cultivé sur milieu de base contenant l'A.I.A. à la concentration de 3.10^{-4} M/l.

TABLEAU 9 *bis*

Quantité de composés indoliques (exprimée en mg/l d'A.I.A. et en % (100 = quantité initiale d'A.I.A. exogène après stérilisation) présente dans le milieu de base lorsque F. vasinfectum *a été ou non ensemencé (E : dans l'extrait éthéré; R : quantité restant dans la gélose après extraction éthérée).*

Jours		A.I.A. donné : 3.10^{-4} M/l					
		E		R		Total	
		mg	%	mg	%	mg	%
Non ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	22	47,3	24	51,6	46	99
	15	20,5	44	25	53,8	45,5	97,8
Ensemencé	0	23,5	50,5	23	49,5	46,5	100
	8	1	2,2	8	17,2	9	19,4
	15	2	4,3	8	17,2	10	21,5

L'analyse chromatographique de la fraction éthérée permet de voir que les corps dosés colorimétriquement sont constitués surtout par de l'A.I.A. (47 %) et par un peu de tryptophane et d'acide β-indolyl-propionique.

b) *A.I.A. restant dans le milieu gélosé après extraction par l'éther.* Par rapport aux séries non ensemencées, l'A.I.A. demeurant dans la gélose, après extraction par l'éther, subit une assez forte diminution après 15 jours de croissance du champignon; il reste alors en effet 17,2 % de la quantité initialement présente dans le milieu après stérilisation. Il s'agit essentiellement d'A.I.A., le tryptophane et l'acide β-indolyl-propionique n'étant présents qu'à l'état de traces (tableau 9).

Ainsi *F. vasinfectum* détruit des quantités notables d'A.I.A. exogène, puisqu'au 8e jour de culture la quantité totale d'A.I.A. présente dans le milieu (extrait éthéré + gélose après extraction éthérée) n'est plus que 19 % de la quantité initiale d'A.I.A. exogène. Cette quantité augmente et devient de 21 % au 15e jour par suite du pouvoir de synthèse du champignon.

Il ressort de ces expériences que :

F. vasinfectum synthétise de l'A.I.A. et d'autres composés indoliques sur milieu de Westergaard et Mitchell modifié, et aussi sur ce milieu contenant des doses élevées d'A.I.A. exogène. Ces corps sont décelables, en dépit du pouvoir de destruction de l'A.I.A. par le champignon qui s'avère important. D'autre part, la présence de l'A.I.A. subsistant en partie au sein de la gélose après extraction éthérée, jointe au grand pouvoir de destruction de l'A.I.A., rendent

difficile une interprétation quantitative correcte des différents aspects du métabolisme de l'auxine chez ce champignon.

II. — MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION EN CULTURES SIMULTANEES

Nous avons vu que *N. galligena* poussant sur des milieux synthétiques contenant de l'A.I.A. a sa croissance inhibée à partir de $1{,}5.10^{-5}$ M/l. Par contre, *F. vasinfectum* mis en présence de $1{,}5.10^{-5}$ à 6.10^{-4} M/l d'A.I.A. n'a pas sa croissance inhibée. Les capacités de synthèse et de destruction de l'auxine par ce dernier champignon ont été aussi analysées. *F. vasinfectum* détruisant une partie de l'A.I.A. exogène qui lui est offert, se comporte donc différemment de *R. nigricans*. Il s'agissait d'éprouver maintenant l'interaction *N. galligena* — *F. vasinfectum*.

TABLEAU 10

Croissance de deux champignons cultivés seuls ou côte à côte (ensemencements diamétralement opposés) dans des boîtes de Petri (110 mm de diamètre) contenant le milieu de Westergaard et Mitchell modifié avec ou sans A.I.A., au 28e jour après l'ensemencement.

A.I.A. (M/l)	CROISSANCE							
	N. galligena seul		*F. vasinfectum* seul		*N. galligena* dans l'interaction : *N. galligena* + *F. vasinfectum*		*F. vasinfectum* dans l'interaction : *N. galligena* + *F. vasinfectum*	
	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)	Poids sec (mg)	Surface (mm^2)
0	43,3	3 525	56,2	5 500	43,5	3 500	56	5 240
3.10^{-4}	20,2	185	55	5 400	26,5	470	56,4	5 400
6.10^{-4}	18,7	80	56,8	5 550	22,8	125	54	5 450

Si on ensemence côte à côte les deux champignons dans des boîtes de Petri renfermant le milieu de base gélosé avec ou sans 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. on constate que :

Sur milieu témoin, la croissance pondérale et en surface de *N. galligena*, comme celle de *F. vasinfectum* est comparable à celle des cultures poussant isolément.

Sur milieu témoin + A.I.A., au 15e jour de culture, *N. galligena* est inhibé; après trois semaines de culture, *N. galligena* présente une auréole de 5 mm. Il a commencé à croître lorsque la distance qui sépare les deux organismes a fortement diminué. Les poids secs de chacun des champignons à cette date confirment les données fournies par les mesures de la croissance en surface des cultures (tableau 10). La figure 14 donne la représentation de cette interaction.

On peut donc constater que l'interaction *F. vasinfectum* — *N. galligena* a lieu tardivement, entre 15 jours et trois semaines après l'ensemencement des deux organismes; elle est, en outre, bien plus faible que dans le cas *R. nigricans* — *N. galligena.*

Ces faits apparaissent d'autant plus curieux que *Fusarium* est capable de détruire de grandes quantités d'A.I.A. Il faut aussi noter que le taux d'A.I.A. dans le milieu, très fortement diminué au 8e jour, semble alors rester stationnaire et même augmenter très légèrement au 15e jour par suite, peut-être, de l'activité synthétique du champignon. Or, c'est précisément à partir du 15e jour que la levée d'inhibition de *N. galligena* poussant côte à côte avec *F. vasinfectum* va commencer à se produire. Cette augmentation de poids de *N. galligena,* malgré l'augmentation relative de la concentration en A.I.A. dans le milieu, ne peut donc être justifiée que par la synthèse de « métabolites antiauxines » par *F. vasinfectum.*

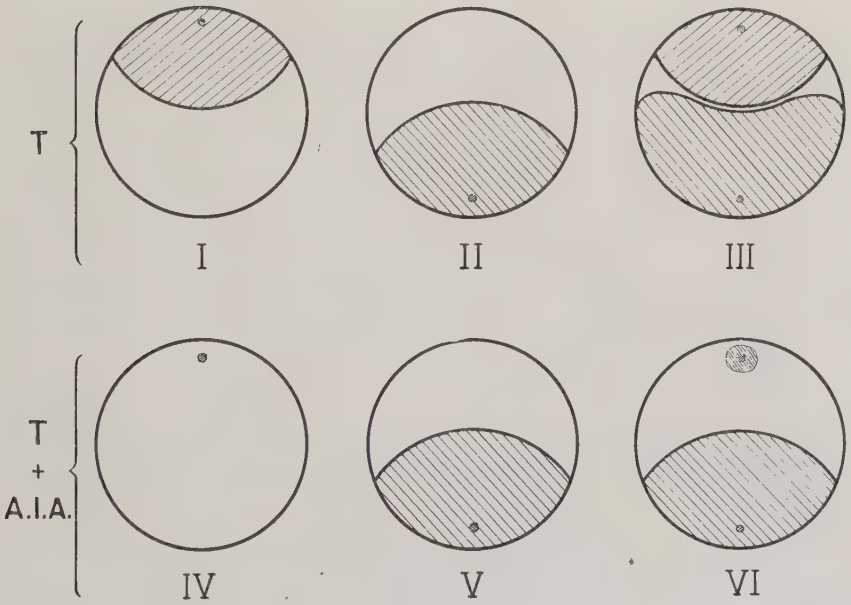


FIGURE 14

Interactions de croissance de F. vasinfectum *et* N. galligena *cultivés sur milieu de base contenant ou non l'A.I.A. Age des cultures : 20 jours; I et IV :* N. galligena *seul; II et V :* F. vasinfectum *seul; III et VI :* N. galligena + F. vasinfectum.

Il était alors fructueux de savoir comme dans le cas de *R. nigricans,* si de tels composés sont présents dans les filaments et dans le milieu de culture de *F. vasinfectum.* Une excrétion tardive et peu importante pourrait expliquer peut-être la faible interaction constatée.

III. — RECHERCHE DE FACTEURS ANTIAUXINIQUES SYNTHETISES PAR *F. VASINFECTUM*

Je donnerai, en premier lieu, les capacités de formation et d'excrétion des facteurs antiauxiniques par *F. vasinfectum* et j'exposerai en deuxième lieu les essais réalisés en vue de l'identification des facteurs décelés.

A. — ACTIVITE DE L'EXTRAIT DE FILAMENTS

Les filaments de cultures de *F. vasinfectum* développées pendant 15 jours sur le milieu liquide de Westergaard et Mitchell modifié sont retirés et un extrait hydrosoluble effectué par stérilisation à 100 °C pendant 30 minutes. Cet extrait est ensuite séché sous vide à 40 °C.

N. galligena est, *dans une première série d'essais,* ensemencé simultanément dans le milieu de base contenant 5 à 160 mg/l d'A.I.A. (1) et dans ce même milieu enrichi de quantités différentes d'extrait (E, 2 E, 4 E, 8 E, 16 E et 32 E [2]).

La figure 15 A représente la croissance de *N. galligena* sous l'action de diverses concentrations d'auxine (courbe a), sous l'action de l'extrait seul aux doses de 17,5 (E) à 560 mg/l (32 E) (courbe b), et enfin en présence des deux produits utilisés (courbe c). On voit qu'aux doses employées, l'extrait exerce une forte accélération de la croissance du champignon test. Fourni en même temps que l'A.I.A. (5 à 160 mg/l), il lève entièrement l'inhibition, même lorsqu'elle atteint 90 %.

Il ressort de cette première série d'expériences que l'extrait, employé à doses assez élevées, exerce deux actions : il accélère très fortement la croissance de *N. galligena;* il renverse entièrement l'action inhibitrice due à l'A.I.A. Mais précisément, à cause de sa grande activité sur la croissance, il devenait difficile de conclure sur les mécanismes mis en cause.

Aussi, dans d'autres séries d'essais, ai-je essayé de voir si de faibles doses d'extrait dépourvues d'action propre sur la croissance de l'organisme peuvent encore lever l'inhibition due à l'auxine.

Après avoir montré qu'avec 0,27 à 2,18 mg/l d'extrait (E/64 à E/8), l'accélération de croissance de *N. galligena* ne dépasse pas 10 à 15 %, c'est-à-dire des valeurs à peine significatives, l'an-

(1) 5 mg/l d'A.I.A. = $0{,}28.10^{-4}$ M/l; 160 mg/l d'A.I.A. = $9{,}1.10^{-4}$ M/l.

(2) La valeur E qui est de 17,5 mg correspond au poids d'extrait sec provenant des filaments d'une culture et demie. Il s'ensuit que E/64 est égal à 0,27 mg et 32 E à 560 mg. En raison de l'activité légèrement différente du produit obtenu d'une extraction à l'autre, j'ai cru préférable de me servir ici de la valeur E.

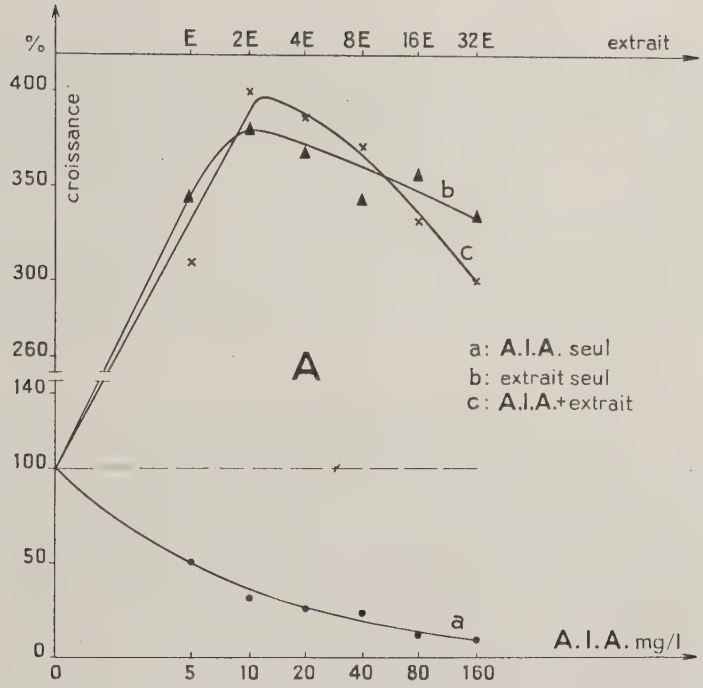


FIGURE 15 A

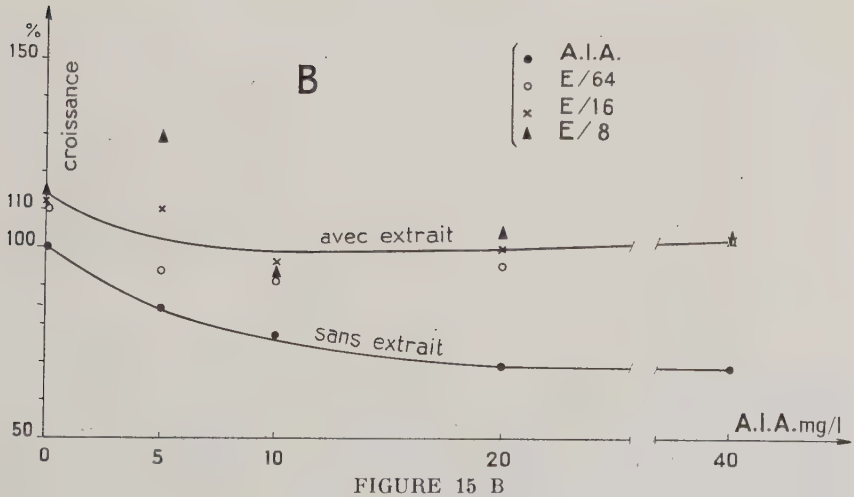


FIGURE 15 B

Croissance pondérale de N. *galligena* (*en pour cent, de celle du témoin* = 100) *cultivé sur milieu de base* (*T*) *en présence ou non d'A.I.A. et avec ou sans extrait de filaments de* F. vasinfectum (*E*). *Age des cultures,* 15 *jours.*

FIGURE 15 A. — *Courbe a : T + A.I.A.; courbe b : T + extrait; courbe c : T + A.I.A. + extrait. En abscisse, les valeurs de E (partie supérieure de la figure) et de l'A.I.A. (partie inférieure de la figure) ont été inscrites suivant une échelle logarithmique; on a admis que log. E est l'équivalent de log.* 5.

FIGURE 15 B. — *Action de faibles doses d'extrait.*

tagonisme de ces doses avec 5 à 40 mg/l d'A.I.A. a été établi. La figure 15 B illustre ces essais. Nous voyons aussi que dans les limites de l'expérimentation réalisée, toutes les doses d'extrait lèvent de la même manière l'inhibition de n'importe quelle dose d'A.I.A. Cette levée d'inhibition est donc de type non compétitif.

Nous retiendrons tout d'abord que :

1) Au moins pour certains rapports extrait-auxine, on peut dissocier l'action propre de l'extrait sur la levée d'inhibition de croissance due à l'auxine, de son action positive sur la croissance de *N. galligena.*

2) *F. vasinfectum* synthétise des substances qui se comportent comme des « métabolites antiauxines » lorsque l'A.I.A. exogène agit comme un antimétabolite chez *N. galligena.*

3) L'antagonisme décrit est sans compétition.

Il ne peut alors être mis en doute que *F. vasinfectum* synthétise des substances possédant une activité autiauxinique chez *N. galligena* inhibé par de fortes doses d'A.I.A. exogène.

B. — ACTIVITE DU MILIEU DE CULTURE DE *F. VASINFECTUM*

L'expérimentation jusqu'ici succinctement décrite a soulevé un problème difficile à résoudre. *F. vasinfectum,* organisme résistant à des doses élevées d'A.I.A. exogène, « n'inter-agit » que tardivement et faiblement avec *N. galligena* inhibé par cette auxine. Cependant, *F. vasinfectum* a la possibilité de synthétiser des quantités importantes de composés antagonistes de l'action inhibitrice provoquée par l'auxine exogène. Pour mieux saisir les contradictions notées à partir des faits ci-dessus, il s'imposait d'établir si au moins certains des corps actifs trouvés dans les filaments sont ou non capables d'être excrétés dans le milieu.

En conséquence, *F. vasinfectum* est ensemencé sur le milieu de base liquide. Après 15 jours, les filaments sont retirés et le milieu est filtré sur bougies Chamberland 5 L 3.

1° *Au cours des premiers essais,* je réalise avec le filtrat du milieu de culture de *Fusarium,* une expérimentation semblable à celle effectuée pour étudier l'activité antiauxinique du milieu où se développe *R. nigricans.*

Dans certaines séries, je mets 22 ml du filtrat brut stérile (correspondant à la quantité moyenne restante du milieu où s'est développée pendant 15 jours une culture de *F. vasinfectum*) dans un erlenmeyer stérile, où j'ai, au préalable, introduit de façon aseptique 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. et 8 ml d'eau gélosée stérile à 52 g/l de manière à ce que la concentration finale en gélose soit de 13 g/l.

Dans d'autres séries, le filtrat brut en question est enrichi aseptiquement par la moitié des sels et du glucose du milieu de WESTERGAARD et MITCHELL modifié (pour contrôle, le milieu entier est étudié simultanément) puis gélosé et additionné d'A.I.A. comme il est décrit ci-dessus.

Dans d'autres séries encore, j'ajoute ou non, selon les cas, au filtrat de culture de *N. galligena,* l'A.I.A., les sels et le glucose du milieu de WESTERGAARD et MITCHELL modifié et la gélose. Ces milieux répartis à raison de 30 ml/erlenmeyer sont stérilisés à 105 °C pendant 20 minutes.

TABLEAU 11

Croissance pondérale (poids sec) et en surface (dimensions) de N. galligena *ensemencé sur le milieu de culture de* F. vasinfectum, *à qui l'on ajoute de la gélose, la ½ concentration en sels et en glucose du milieu de Westergaard et Mitchell modifié (W.M.) et de l'A.I.A.* (3.10^{-4} *M/l*).

TRAITEMENT	GELOSE (13 g/l) +					
	Eau sans apport du milieu où s'est développé *F. vasinfectum*		Milieu liquide où s'est développé *F. vasinfectum* filtré ensuite sur bougies Chamberland (2)			
			Introduit à *froid* dans le substratum (1)		Stérilisation à 105 °C 20 mn	
	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)	Poids sec (mg)	Dimensions (mm)
0			22	55 × 50	21,6	53 × 51
A.I.A.			22,2	50 × 50	23	51 × 52
½ sels + ½ glucose du milieu W.M.	37,7	64 × 64	41	66 × 66	41,7	66 × 66
Milieu W.M. entier	43	64 × 64				
½ sels + ½ glucose du milieu W.M. + A.I.A.	10,8	37 × 35	40,6	66 × 64	40,7	66 × 64
Milieu W.M. entier + A.I.A. .	15,8	36 × 34				

(1) Dans ce cas, la gélose a été additionnée de façon stérile à l'aide d'une solution très concentrée (52 g/l) ayant subi une stérilisation préalable.

(2) Pour comparaison, le poids sec de *N. galligena,* poussant sur le filtrat gélosé du milieu liquide contenant l'A.I.A. (3.10^{-4} M/l) où s'est développé *F. vasinfectum,* est de 17,8 mg.

Sur ces différents substratums contenant l'A.I.A. et le filtrat de culture de *F. vasinfectum,* qu'ils soient stérilisés à froid ou à chaud, on constate essentiellement que *N. galligena* n'a plus sa croissance inhibée (tableau 11); il faut, bien sûr, tenir compte du fait que l'apport du filtrat seul ne suffit pas pour avoir une croissance suffisante, puisque *F. vasinfectum* a déjà épuisé son milieu

lorsqu'on l'offre à *N. galligena;* l'adjonction de sels minéraux et de glucose au filtrat de *Fusarium* rétablit une croissance tout à fait égale au témoin. On note de plus que les substances contenues dans ce filtrat sont thermostables.

2° *Au cours d'autres essais,* le filtrat brut en question est desséché sous vide à 40° C et ajouté à différentes doses (S/64, S/16, S/8, S/4, S/2, S, 2 S, 4 S, 8 S, 16 S et 32 S (1) par litre du milieu de base additionné ou non de $1{,}5.10^{-5}$ à $9{,}1.10^{-4}$ M/l d'A.I.A. et de gélose.

La figure 16 A nous permet tout d'abord de constater que :

— *N. galligena,* cultivé sur milieu de base additionné du filtrat brut aux doses de S et 2 S, a sa croissance inhibée. Au contraire, les doses ⩾ 4 S ont un effet accélérateur sur la croissance de l'organisme test (courbe b).

— Lorsque le milieu de base contient de l'A.I.A., l'effet inhibiteur provoqué par S et 2 S de filtrat brut du milieu de *Fusarium* sur la croissance du champignon test, s'ajoute à l'inhibition auxinique. Par contre, les doses de filtrat égales et supérieures à 4 S exercent une action antiauxinique de plus en plus marquée; en effet 4 et 8 S lèvent partiellement l'inhibition de $1{,}2.10^{-4}$ M/l d'A.I.A. et 16 et 32 S lèvent totalement l'inhibition de croissance due à l'A.I.A. (courbe c).

Il était, dans ces conditions, très intéressant de connaître l'action de très faibles doses de filtrat brut de *Fusarium.* En conséquence, l'action sur la croissance de *N. galligena* de S/64, S/8, S/4 de filtrat a été recherchée. Elle s'avère pratiquement nulle (figure 16 B). En présence d'A.I.A., le filtrat de milieu de *Fusarium* exerce, pour ces mêmes doses de S/64, S/8, S/4, une nette action antiauxinique. S/64 lève totalement l'inhibition provoquée par $1{,}2.10^{-4}$ M/l d'A.I.A.

Ces derniers résultats montrent aussi l'absence d'action compétitive du filtrat du milieu de *Fusarium* sur la levée d'inhibition auxinique (figure 16 B).

En outre, l'ensemble de cette expérimentation souligne qu'il existe une zone de concentrations du milieu de culture de *Fusarium* où ce milieu non seulement est moins actif, mais où il est de plus inhibiteur par son action propre. Cet effet inhibiteur devient pratiquement nul lorsque le milieu *Fusarium* est présent à doses très faibles, ou au contraire, à doses très fortes. Dans ce dernier cas, la substance à forte activité antiauxinique est en quantité suffisamment importante pour contrebalancer l'effet inhibiteur des di-

(1) La valeur S qui est de 213,4 mg correspond au poids de résidu sec provenant du milieu d'*une culture et demie.* Il s'ensuit que S/64 est égal à 3,3 mg. Comme pour la valeur E, en raison de l'activité légèrement différente du produit obtenu d'une expérience à l'autre, j'ai cru préférable de me servir de la valeur S.

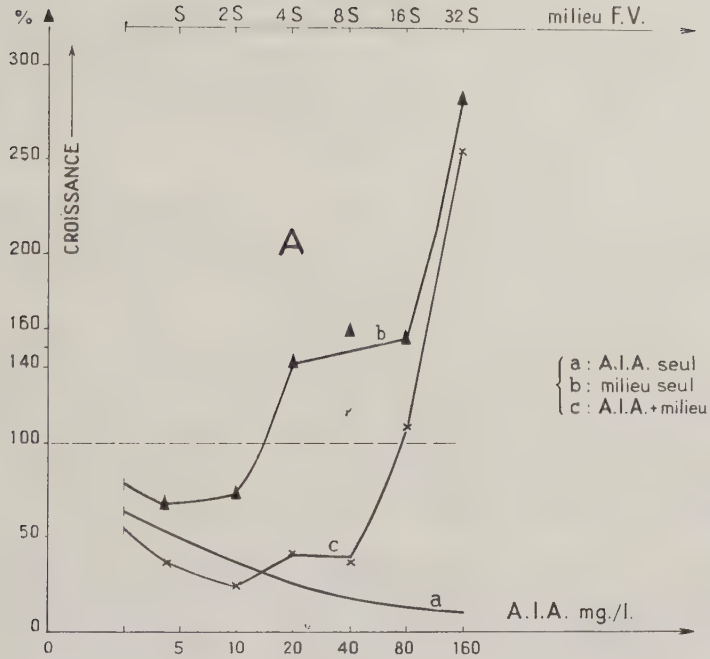


FIGURE 16 A

Action sur la croissance de N. galligena (*en pour cent de la croissance du témoin* = 100) *de doses croissantes d'A.I.A.* (*a*), *du filtrat du milieu de culture de* F. vasinfectum, *aux concentrations de S, 2 S, 4 S, 8 S et 32 S* (*b*), *et de la combinaison A.I.A.* + *filtrat du milieu de* Fusarium (*c*). *Age des cultures :* 15 *jours.*

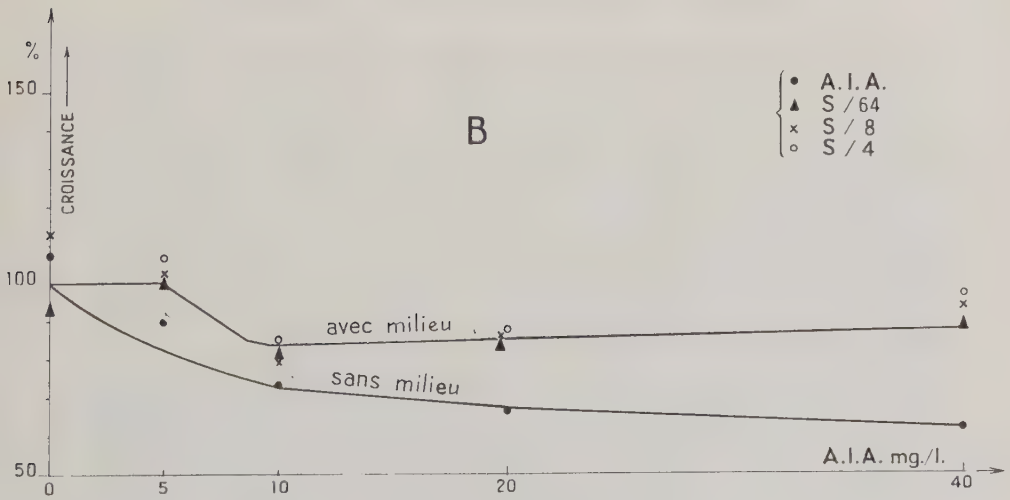


FIGURE 16 B

Action de faibles doses du filtrat brut du milieu de culture de F. vasinfectum (*S/64, S/8, S/4*) *sur la levée de l'inhibition de croissance provoquée chez* N. galligena *par l'A.I.A.*

verses autres substances qui gêneraient son action. On peut même remarquer que lorsqu'on emploie des doses de 16 S par litre (correspondant à 0,72 culture pour 30 ml de milieu) et 32 S (correspondant à 1,44 culture pour 30 ml de milieu), l'action de l'extrait sec du milieu se rapproche des conditions naturelles où le filtrat d'*une culture* de *F. vasinfectum* lève l'inhibition d'*une culture* de *N. galligena* inhibée par l'A.I.A.

Quoi qu'il en soit sur l'intimité de la réaction, qu'à ce stade de recherche nous ne pouvons encore qu'apprécier globalement, l'examen détaillé de l'action antiauxinique du milieu de culture de *F. vasinfectum* fait ressortir que :

F. vasinfectum *non seulement synthétise, mais sécrète aussi dans son milieu de culture une ou des substances, à activité antiauxinique sur* N. galligena, *thermostables, et agissant à faibles doses. Leur action semble non compétitive avec celle de l'A.I.A.* F. vasinfectum *sécrète également divers corps qui se comportent comme des inhibiteurs de la croissance de* N. galligena *et dont l'activité est masquée sous certaines conditions.*

Ainsi, *F. vasinfectum,* comme *R. nigricans,* non seulement synthétise, mais sécrète aussi des quantités notables de « métabolites antiauxines », actifs à faibles doses sur la croissance du test *N. galligena,* mais dont l'activité ne peut se manifester *réellement* dans le cas de l'interaction de *N. galligena* — *F. vasinfectum* sur milieu gélosé.

C. — ESSAIS DE DETERMINATION DES FACTEURS ANTIAUXINIQUES DE *F. VASINFECTUM*

Les facteurs formés par *F. vasinfectum,* quoiqu'actifs à faibles doses, sont peu ou pas diffusibles dans la gélose. Par ce dernier caractère, leur nature paraît donc différente de celle des composés responsables de l'interaction *R. nigricans* — *N. galligena.* Aussi ai-je été amenée à faire un fractionnement systématique des extraits bruts pour l'isolement de ces facteurs. J'ai étudié simultanément l'action des substances antiauxiniques du milieu sur lequel s'est développé *F. vasinfectum* et de l'extrait de ses filaments. Cela a permis de connaître s'il s'agit bien des mêmes « métabolites antiauxines » ou si ces métabolites, à la suite de leur excrétion, ont subi une transformation quelconque. En conséquence :

1° *L'extrait de filaments et le milieu de culture de* F. vasinfectum sont tout d'abord séparés sur *colonnes échangeuses d'ions* (Dowex 50 et 1). L'extrait de filaments provient de 30 cultures de *F. vasinfectum,* le milieu de culture est celui où s'est développé ce même nombre de cultures. La fraction « basique » est éluée par une solution d'ammoniaque 2 N, la fraction « acide » par du carbonate d'ammonium 2 N. Chacune des fractions recueillies, y compris la « non ionique », desséchée sous vide à 40° C, est d'une

part, expérimentée sur *N. galligena,* d'autre part, analysée par chromatographie de partage sur papier.

Les résultats résumés dans les tableaux 12 et 12 *bis* et la figure 17 sont les suivants :

TABLEAU 12

Croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base (témoin = 100) contenant l'A.I.A. et certaines des fractions du milieu sur lequel s'est développé* F. vasinfectum.

A.I.A. (M/l)	Fractions du filtrat de culture de *F. vasinfectum*			
	0	« acide »	« basique »	« non ionique »
0	100	146,4	157,1	99,4
$1{,}5.10^{-4}$	51,7	185,7	64,5	51,7
3.10^{-4}	46,2	105,1	64,5	46,9

TABLEAU 12 *bis*

Croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base (témoin = 100) contenant l'A.I.A. et certaines des fractions de l'extrait de filaments de* F. vasinfectum.

A.I.A. (M/l)	Fractions de l'extrait de filaments de *F. vasinfectum*			
	0	« acide »	« basique »	« non ionique »
0	100	339	281	68
$1.5.10^{-4}$	51,7	264	232	52
3.10^{-4}	46,2	263	219	48

a) *La fraction « acide »*, qu'il s'agisse de l'extrait de filaments ou du milieu de culture, possède une activité antiauxinique importante sur *N. galligena.* Quant à *la fraction « basique »* du filtrat de culture de *F. vasinfectum,* son activité antiauxinique est très faible en dépit de son action propre élevée exercée sur la croissance du champignon test; la *fraction « basique »* de l'extrait de filaments lève entièrement l'inhibition de croissance due à A.I.A. chez *N. galligena,* mais il faut noter là aussi que l'extrait provoque une forte accélération de la croissance du témoin, rendant plus ambiguë l'interprétation des résultats. Enfin la *fraction « non ionique »* se révèle incapable de lever l'inhibition due à l'A.I.A. chez *N. galligena.*

b) L'extrait de filaments de *F. vasinfectum* ou ses fractions « acide » et « basique » sont presque toujours beaucoup plus actifs que le filtrat du milieu de culture ou les fractions « acide » et « basique » obtenues à partir du filtrat de ce même milieu.

c) L'analyse chromatographique permet d'identifier aussi bien dans les filaments que dans le milieu de culture de *F. vasinfectum* :

— pour la fraction « acide », les acides citrique, malique, succinique, lactique, citraconique, citramalique, gluconique; l'évaluation semi-quantitative des taches (tableau 13) (1) montre toujours plus d'acides organiques dans le milieu de culture que dans l'extrait de filaments;

— pour la fraction « basique » (2), les acides glutamique, aspartique, γ-aminobutyrique et pipécolique, l'alanine, les sérine, glycocolle, thréonine, valine, lysine, histidine, arginine, leucines, proline, tyrosine, asparagine, glutamine, citrulline.

Il pouvait alors apparaître que l'activité antiauxinique des extraits ou du filtrat puisse être imputable aux éléments banaux du métabolisme.

J'ai cherché à vérifier cette dernière hypothèse en m'attachant essentiellement, pour les raisons déjà indiquées, à l'étude de la fraction « acide ». A cet effet, je fournis les acides organiques que je viens de signaler, à l'état pur, au milieu de base contenant ou non l'A.I.A.; ces acides sont ajoutés seuls ou en combinaisons dans les proportions rencontrées dans le milieu de culture de *F. vasinfectum* ou de son extrait de filaments. Dans ces conditions, ils ne présentent pas, comme l'indique le tableau 13 *bis*, d'activité antiauxinique sur *N. galligena*.

2° L'hypothèse de l'intervention des acides organiques banaux étant exclue il fallait rechercher d'autres facteurs dans la fraction « acide ».

A cet effet, deux séries de fractionnements ont été entreprises :

a) *En premier lieu*, à partir du milieu de culture de *F. vasinfectum* ou bien de son extrait de filaments, cinq fractions égales ont été recueillies au cours de l'élution de la *colonne Dowex* 1 par le $(NH_4)_2CO_3$ (2N) (cf. figure récapitulative 19) (3).

---

(1) J'ai cru préférable de ramener les teneurs des produits de métabolisme analysés à des valeurs de poids sec de mycélium, principalement pour la raison suivante : lorsque les filaments sont retirés d'un milieu *liquide*, lavés à l'eau et pressés entre des feuilles de papier filtre, il subsiste toujours une quantité plus ou moins contrôlable d'eau qui fausse ainsi la valeur de poids frais que l'on peut alors mesurer. De plus, la croissance des champignons est constamment exprimée, dans ce travail, en valeurs de matière sèche de filaments.

(2) Mon Directeur de Recherches, M. F. Nysterakis, ayant une partie de son activité consacrée à l'étude des acides aminés dans la levée d'inhibition de croissance de *N. galligena*, je ne donnerai qu'un aperçu des phénomènes concernant cette voie.

(3) Cf., p. 75.

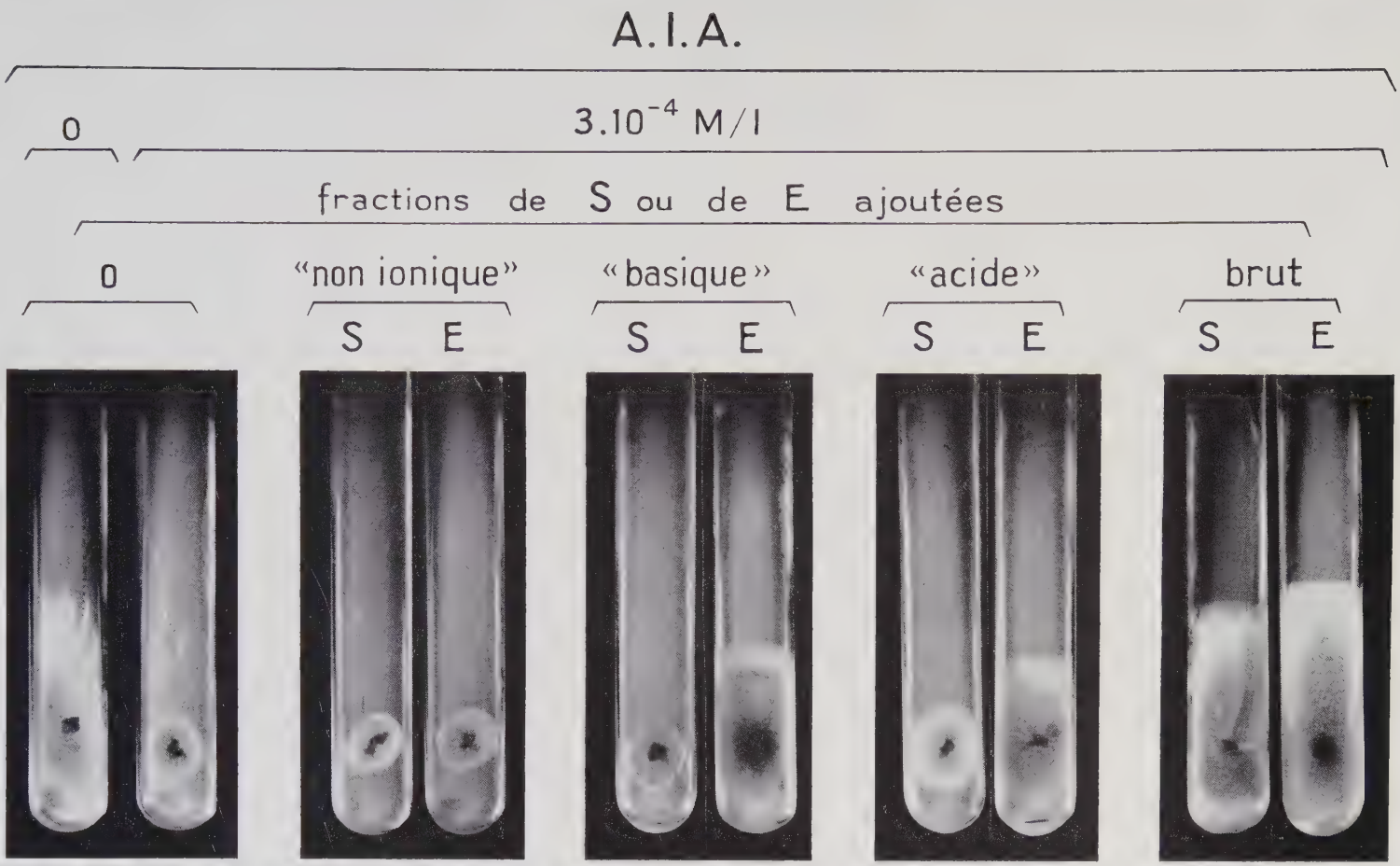


FIGURE 17

Action de différentes fractions de l'extrait de filaments (E) et du filtrat de culture (S) de F. vasinfectum *sur la croissance de* N. galligena. *Age des cultures : 15 jours.*

TABLEAU 13

Quantités d'acides organiques contenues dans l'extrait de filaments et le milieu de culture de F. vasinfectum.

	malique	succinique	citra-malique	citrique	lactique	citra-conique	gluconique
Extrait de filaments de F. vasinfectum							
% de l'ensemble des acides	43	13	34	8	traces	traces	traces
µg par tache chromatographiée (correspondant au 1/5e d'une cult.)	53	16	42	10	?	?	?
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec	0,6	1,8	4,7	1,1	?	?	?
mg d'acides contenus dans l'extrait de filaments de 30 cultures et ajoutés dans un litre de milieu de base	8	2,4	6,3	1,5	?	?	?
Milieu de culture de F. vasinfectum							
% de l'ensemble des acides	14	40	11	9	1	15	9
µg par tache chromatographiée (correspondant au milieu où a poussé 0,06 culture)	63,6	182,2	50	41	4,5	68,2	41
mg d'acides provenant du milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs	20,9	59,5	4,4	13,4	1,5	22,2	13,4
mg d'acides contenus dans le milieu où ont poussé 30 cultures et ajoutés dans un litre de milieu de base	28,2	80,9	5,7	18,2	2	30,2	18,2

TABLEAU 13 *bis*

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *cultivé pendant* 15 *jours sur milieu de base avec ou sans A.I.A. et en présence ou non des mêmes quantités des principaux acides organiques contenus dans le milieu de culture de* F. vasinfectum, *soit seuls (« milieu »), soit mélangés dans les proportions relatives de l'ensemble des acides organiques du milieu (mélange « milieu ») ou de l'extrait de filaments (mélange ext. fil.).*

A.I.A. (M/l)	0	malique « milieu »	succinique « milieu »	citrique « milieu »	lactique « milieu »	citra-malique « milieu »	gluconique « milieu »	mélange « milieu »	mélange ext. fil.	milieu brut	ext. brut de filaments
0	11,5	12,6	11,5	10,9	11	11,9	15,8	12,5	13	20	51
$1{,}5.10^{-4}$	6,6	8,6	7	7,2	7,1	6,8	7,9	7,8	7,2	10,9	52
3.10^{-4}	5	5,8	4,2	5,5	—	4	3,7	6,2	3,5	10,2	49

Il en résulte que :

— seules, les deux premières parties renfermant également la totalité des acides organiques, contiennent les facteurs antiauxiniques;

— les 3 autres parties sont, soit sans action, soit assez inhibitrices de la croissance de *N. galligena.*

b) *En deuxième lieu, la recherche des facteurs actifs de* F. vasinfectum *a été poursuivie sur colonne de célite à partir de l'ensemble des deux fractions actives éluées de Dowex* 1 que je réunis. Ceci a été fait suivant la technique classique d'élution des acides organiques par le mélange chloroforme-butanol estérifié par l'acide sulfurique (0,5 N), où le premier traitement est constitué par du chloroforme pur, auquel on incorpore des proportions croissantes de butanol pour aboutir en dernier lieu au butanol pur. L'éluat, dans mes expériences, est donc constitué de dix parties, la première ne contenant pas de butanol, la dernière ne contenant plus de chloroforme (tableau 14). Enfin, chacune de ces fractions est évaporée sous vide, puis expérimentée sur *N. galligena.*

TABLEAU 14

Première série de solvants employés pour l'élution, sur colonne de célite (1), *des facteurs antiauxiniques de* F. vasinfectum *contenus dans la « fraction acide » de l'extrait brut de filaments ou du filtrat du milieu de culture* (*cf. figure récapitulative* 19).

	Chloroforme		Butanol		SO_4H_2 (0,5 N)
	ml	%	ml	%	
1	150	100	—	0	—
2	275	92	24	8	30
3	261	87	39	13	30
4	240	80	60	20	30
5	216	72	84	28	30
6	198	66	102	34	30
7	180	60	120	40	30
8	150	50	150	50	30
9	120	40	180	60	30
10	—	0	150	100	—

(1) J'ai utilisé une colonne de célite de diamètre 20 mm et de longueur 40 cm pesant 10 g.

Les résultats essentiels consignés dans les tableaux 15 et 15 *bis* et la figure récapitulative 19 font principalement apparaître que :

— les huit premières parties de la « fraction acide » se montrent soit inactives, soit même parfois légèrement inhibitrices de la croissance du champignon test;

— *la fraction n°* 10 entraînée par le butanol pur et déjà la fraction n° 9 (dans la majorité des répétitions pour l'extrait de filaments seulement), *alors qu'elles ne contiennent plus d'acides organiques décelables par chromatographie de partage sur papier, ont une action antiauxinique comparable à celle de la fraction « acide » tout entière.* En effet, ces fractions expérimentées avec *N. galligena* renversent l'action inhibitrice de 1,5 à 3.10^{-4} M/l d'A.I.A;

— les facteurs actifs pour lever l'inhibition auxinique de croissance et isolés dans les fractions sus-mentionnées sont thermostables, solubles dans l'eau, le butanol, le carbonate d'ammonium.

c) Les substances antiauxiniques en question, débarrassées des acides organiques banaux, sont entraînées en partie par le solvant n° 9 contenant 40 % de chloroforme et 60 % de butanol, et la partie restante par le butanol pur (solvant n° 10). J'ai donc réuni les fractions n° 9 et 10, totalisant toute l'activité antiauxinique, et leur ai fait subir à nouveau la même extraction sur célite, mais en ramenant cette fois de 8 à 3 le nombre de solvants contenant plus de 50 % de chloroforme et en faisant passer de 3 à 6 le nombre de solvants renfermant plus de 50 % de butanol (tableau 16).

Dans une première série d'expériences l'activité antiauxinique sur la croissance inhibée de *N. galligena* est décelée dans les fractions n° 6 à 9 et principalement dans la fraction n° 7 (tableau 16 *bis*).

Je reprends alors *dans une deuxième série d'expériences* cette même extraction sur célite, avec la même gamme de solvants chloroforme-butanol, mais en faisant varier uniquement leur volume (tableau 16). Les fractions n° 6 et 7, entraînées seulement par les solvants contenant plus de 75 % de butanol, sont, non plus éluées globalement, mais traitées au *collecteur de fractions.* Il est apparu que l'activité antiauxinique augmente progressivement tout au long de l'élution de la fraction n° 6 (a, b, c, d) et de la fraction n° 7 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) (figure 18). Cependant, malgré le grand volume de solvant n° 7 employé, toute la substance active n'a pu être extraite. Ce résultat indique, d'une part, les limites de notre manière d'opérer et, d'autre part, que la substance antiauxinique, très active, doit se trouver en faible concentration.

TABLEAUX 15 ET 15 *bis*. — *Croissance pondérale de* N. galligena *cultivé sur milieu de base (témoin = 100) avec A.I.A. et certaines fractions de l'extrait de filaments ou du milieu sur lequel s'est développé* F. vasinfectum (*cf. tableau* 14).

TABLEAU 15

A.I.A. (M/l)	Filtrat de culture de *F. vasinfectum*											
	0	Fraction « acide » éluée de Dowex 1	Partie active de l'éluat de Dowex 1	Fractions de la partie active de l'éluat de Dowex 1 après la 1re séparation sur célite									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	109	112	95	95	93	100	98	90	97	98	99	190
$1{,}5.10^{-4}$	40	106	106	34	34	34	49	38	37	41	32	38	149
3.10^{-4}	29	97	104	33	34	32	39	33	27	32	38	35	99

TABLEAU 15 *bis*

A.I.A. (M/l)	Extrait de filaments de *F. vasinfectum*											
	0	Fraction « acide » éluée de Dowex 1	Partie active de l'éluat de Dowex 1	Fractions de la partie active de l'éluat de Dowex 1 après la 1re séparation sur célite									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	100	102	82	93	94	97	101	81	80	113	129	150
$1{,}5.10^{-4}$	37,4	110	120	36	39	34	32	40	32	34	30	74	113
3.10^{-4}	23,6	109	115	24	27	25	29	37	21	30	28	84	121

TABLEAU 16

Solvants chloroforme - butanol utilisés pour la purification des substances antiauxiniques de F. vasinfectum *contenues dans les fractions n° 9 et 10 extraites après une première séparation sur célite (cf. figure récapitulative 19).*

Solvants	1re *série d'expériences*					2e *série d'expériences*				
	Chloroforme		Butanol		SO_4H_2 (0,5 N)	Chloroforme		Butanol		SO_4H_2 (0,5 N)
	ml	%	ml	%	ml	ml	%	ml	%	ml
1	270	90	30	10	30	270	90	30	10	30
2	100	66	50	34	15	100	66	50	34	15
3	75	50	75	50	15	75	50	75	50	15
4	120	40	180	60	30	120	40	180	60	30
5	100	34	200	66	30	200	34	400	66	60
6	75	25	225	75	30	75	25	225	75	30
7	50	17	250	83	30	100	17	500	83	60
8	25	8	275	92	30	25	18	275	92	30
9	—		300	100	—	—		300	100	—

Croissance pondérale de N. galligena *sur milieu de base (témoin = 100), avec A.I.A. et certaines fractions de l'extrait de filaments ou du milieu sur lequel s'est développé* F. vasinfectum, *entraînées par les solvants du t.* 16 (*t.* 16 bis : *cf.* 1re *série d'expériences; fig.* 18 : *cf.* 2e *série d'expériences, et pour l'extrait de filaments seulement*).

TABLEAU 16 *bis*

A.I.A. (M/l)	Fractions du *filtrat de culture* de la partie active de l'éluat de Dowex 1 après la deuxième séparation sur célite									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	100	79	80	72	62	41	114	187	137	165
$1{,}5.10^{-4}$	57	56	51	50	45	47	101	228	212	215
3.10^{-4}	39	41	39	34	23	25	86	225	200	194
	Fractions de l'*extrait de filaments* de la partie active de l'éluat de Dowex 1 après la deuxième séparation sur célite									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	100	83	81	82	60	54	150	192	123	125
$1{,}5.10^{-4}$	60	59	55	57	36	30	91	212	212	104
3.10^{-4}	42	40	38	37	30	28	82	240	217	100

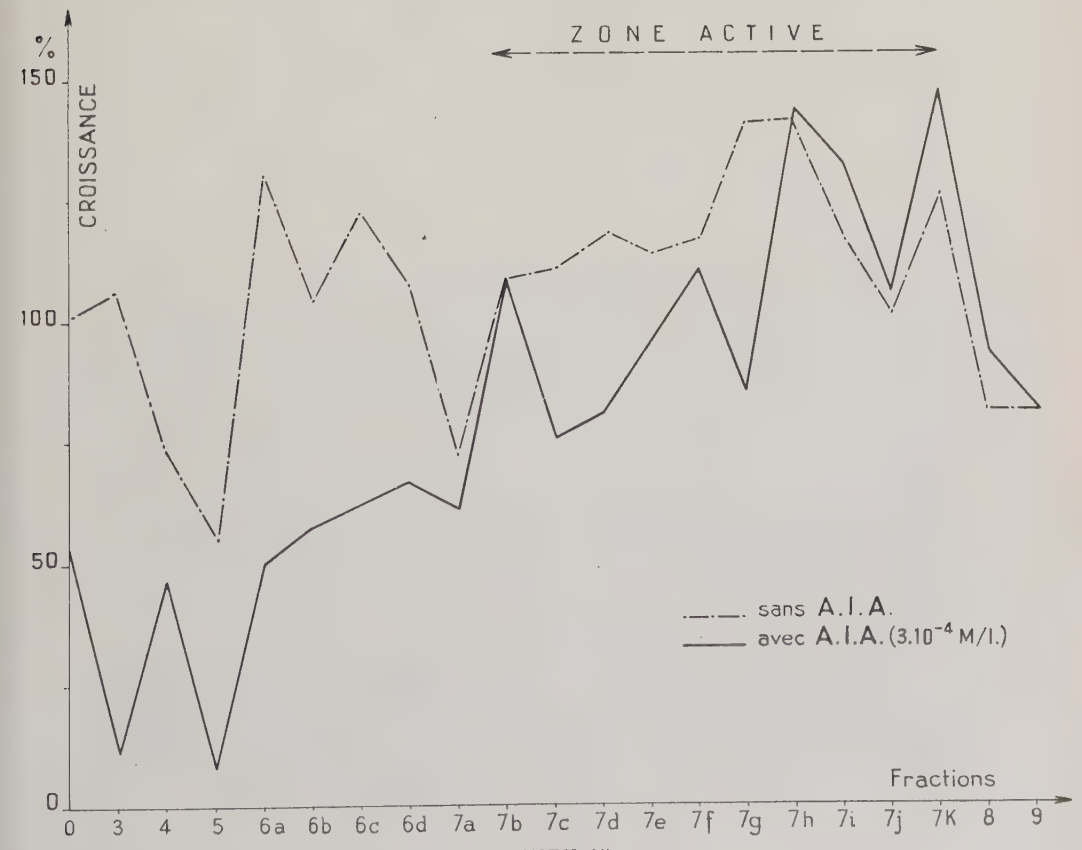


FIGURE 18

J'ai repris séparément toutes les parties les plus actives de la fraction n° 7 (d à k) et les ai chromatographiées sur papier Arches 302 à l'aide du mélange classique (butanol-acide formique-eau) utilisé pour les acides organiques (1). Des morceaux de chromatogrammes monodimensionnels ont été ensuite introduits dans le milieu de base habituel additionné ou non d'A.I.A. (3.10^{-4} M/l). Puis *N. galligena* a été ensemencé. Aucun résultat positif n'a été obtenu. Aussi ai-je poursuivi cette recherche avec les solvants employés *pour la chromatographie des substances de croissance* (2). Le mélange isopropanol-ammoniaque-eau (10-1-1) (v/v/v), en chromatographie descendante, s'est montré favorable pour une bonne séparation des substances contenues dans la fraction active provenant de l'isolement sur colonne de célite. J'ai alors introduit dans le milieu de base habituel additionné ou non de 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., des morceaux de chromatogrammes monodimensionnels de façon à circonscrire la zone où migrent les substances antiauxiniques. Puis *N. galligena* est ensuite ensemencé. Il a pu être constaté que :

α) *En ce qui concerne le filtrat de culture de* F. vasinfectum :

— Dans la fraction active n° 7 provenant du dernier isolement sur célite, existent plusieurs substances légèrement inhibi-

---

(1) Le papier après séchage est coupé en 96 fragments, de 3 cm de long et 2 cm de large. Chacun de ces morceaux est introduit dans un tube contenant déjà 20 ml de milieu gélosé chaud et agité. Pour contrôle, j'ai expérimenté sur la croissance de *N. galligena* en milieu témoin et lors de son inhibition par l'auxine, l'action propre du papier du chromatogramme suivant le protocole déjà indiqué. J'ai pu noter que dans un groupe d'expériences, ce papier a provoqué une légère accélération de croissance et a diminué la valeur de l'inhibition que l'on aurait dû trouver (ex. : Témoin = 23,5 mg; Témoin + papier = 29 mg; Témoin + A.I.A. = 9 mg; Témoin + papier + A.I.A. = 16,7 mg). Toutefois, dans un autre groupe d'expériences, ce papier s'est montré légèrement inhibiteur (ex. : Témoin = 29,5 mg; Témoin + papier = 25 mg; Témoin + A.I.A. = 9 mg; Témoin + A.I.A. + papier = 7 mg). Enfin, pour éprouver *quantitativement* la valeur antiauxinique de la zone qui pouvait être active, j'ai ajouté, par tube, 2 puis 3 fragments de la même zone de Rf. Je n'ai pas constaté dans le cas de la chromatographie utilisant butanol-acide acétique-eau davantage d'activité antiauxinique sur *N. galligena* avec 2 ou 3 fragments.

(2) Le protocole expérimental décrit en (1) est également adopté ici.

L'addition, par tube de culture, de 2 ou 3 fragments de chromatogrammes au lieu d'un seul, n'augmente par la levée de l'inhibition de croissance provoquée par l'A.I.A. chez *N. galligena*. Ex. : Témoin + papier = 25 mg; Témoin + A.I.A. + papier = 7 mg; Témoin + A.I.A. + zone active papier (1 fragment) = 20 ± 5 mg; Témoin + A.I.A. + zone active papier (3 fragments) = 20 ± 5 mg.

TABLEAU 17

Croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base avec ou sans A.I.A. (à la concentration de* 3.10^{-4} *M/l) et additionné de fractions de chromatogrammes obtenus par chromatographie monodimensionnelle avec le mélange isopropanol-ammoniaque-eau d'une fraction purifiée du* filtrat de culture *de* F. vasinfectum *provenant de l'élution sur célite.*

	Fragment n°	Papier du chromat.	Parties de la fraction n° 7 active antiauxiniquement provenant de la 2e séparation sur célite du *filtrat de culture* de *F. vasinfectum*							
			d	e	f	g	h	i	j	k
Témoin		25								
Témoin + A.I.A.		7								
Témoin + A.I.A. + fragments de chromatogrammes de Rf :										
0 à 8,3	1		6	9,5	9,2	7	7	6,5	7,5	6,5
8,3 — 16,5	2		19	25,5	18,5	20	18	15	15,5	13,4
16,5 — 25	3		6,5	13,7	7,5	15,7	9,5	9,2	12	6
25 — 33	4		7	7	6,7	7	7	8,5	8	6,5
33 — 41,5	5		6	7,5	7	6,5	7,5	7	8	6
41,5 — 50	6		8	6	7	7	7,5	7	7,5	7,2
50 — 58	7		6	6,5	6,5	5,5	8	6,5	7,5	7
58 — 67	8		5	6,5	6	7	8	8,5	9	6,7
67 — 75	9		6	7	6	6	8,5	13	7,7	6
75 — 83	10		6,2	6,2	7	6	7,5	8,2	8	6
83 — 92	11		6	6,5	6,5	6,2	8,2	6,5	8	6,2
92 — 100	12		6,5	5,5	6,5	6,5	6,5	7,5	8,5	6

trices ou inactives sur la croissance de *N. galligena,* associées au facteur antiauxinique et dont seule la chromatographie de partage sur papier a permis la séparation. *Ce facteur antiauxinique* a un Rf situé entre 8 et 25. Si, au lieu de mesurer la distance par rapport au front du solvant, on l'évalue par rapport à l'A.I.A. (1) que l'on fait égal à 100, le $R_{A.I.A.}$ du facteur antiauxinique est d'environ 25 à 50.

(1) Dans mes expériences, avec les solvants et le temps de migration adoptés le Rf de l'A.I.A. par rapport au front est de 36.

TABLEAU 17 *bis*

Croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base avec ou sans A.I.A. (à la concentration de* 3.10^{-4} *M/l) et additionné des fractions de chromatogrammes obtenus par chromatographie monodimensionnelle avec le mélange isopropanol-ammoniaque-eau d'une fraction purifiée de* l'extrait de filaments *de* F. vasinfectum *provenant de l'élution sur célite.*

	Fragment n°	Papier du chromat.	Parties de la fraction n° 7 active antiauxiniquement provenant de la 2e séparation sur célite de l'*extrait de filaments de F. vasinfectum*							
			d	e	f	g	h	i	j	k
Témoin		29								
Témoin + A.I.A.		16,7								
Témoin + A.I.A. + fragments de chromatogrammes de Rf :										
0 à 8,3	1		10,7	10,7	16	9	8,5	10	7,5	9
8,3 — 16,5	2		26,5	15	22,3	12,5	15,5	20	22,5	23
16,5 — 25	3		24,5	16,5	27,5	13,5	15,5	14,5	18,5	22,7
25 — 33	4		24,5	15	19,2	13,7	14	14,2	21,2	15,7
33 — 41,5	5		17	16,5	17	14	15	12,5	18	15
41,5 — 50	6		19,5	16,5	17,7	15	15,2	16,2	14,5	14
50 — 58	7		19,2	18,2	17,5	15,2	13	14	16,2	17
58 — 67	8		19	17,5	18,5	14,5	13,2	11	12,5	13,7
67 — 75	9		19	14	16	12,5	15	14,5	14	14
75 — 83	10		20,5	15,5	25,5	13,5	15,5	20,5	12,7	13,7
83 — 92	11		24,5	17,5	21	22,5	17,2	14,5	13,5	16,5
92 — 100	12		15,5	17,5	18	14	16,2	12,5	12,5	13

— Aucun révélateur habituellement employé pour les composés indoliques (2.4.5-para-aminobenzaldéhyde, réactif de Salkowski, etc.) n'a donné la possibilité d'identifier le facteur antiauxinique, au moins aux concentrations utilisées. Il est présent en très faibles quantités; en effet, 30 cultures ayant poussé dans 600 ml de milieu libèrent avec ce mode d'extraction des quantités extrêmement faibles de ce corps, qui sera nommé « facteur *Fusarium I* ».

— Le facteur *Fusarium I* annule entièrement l'action inhibitrice due à l'A.I.A. sur la croissance de *N. galligena*. L'antagonisme observé est indépendant de la dose du facteur *Fusarium* introduite

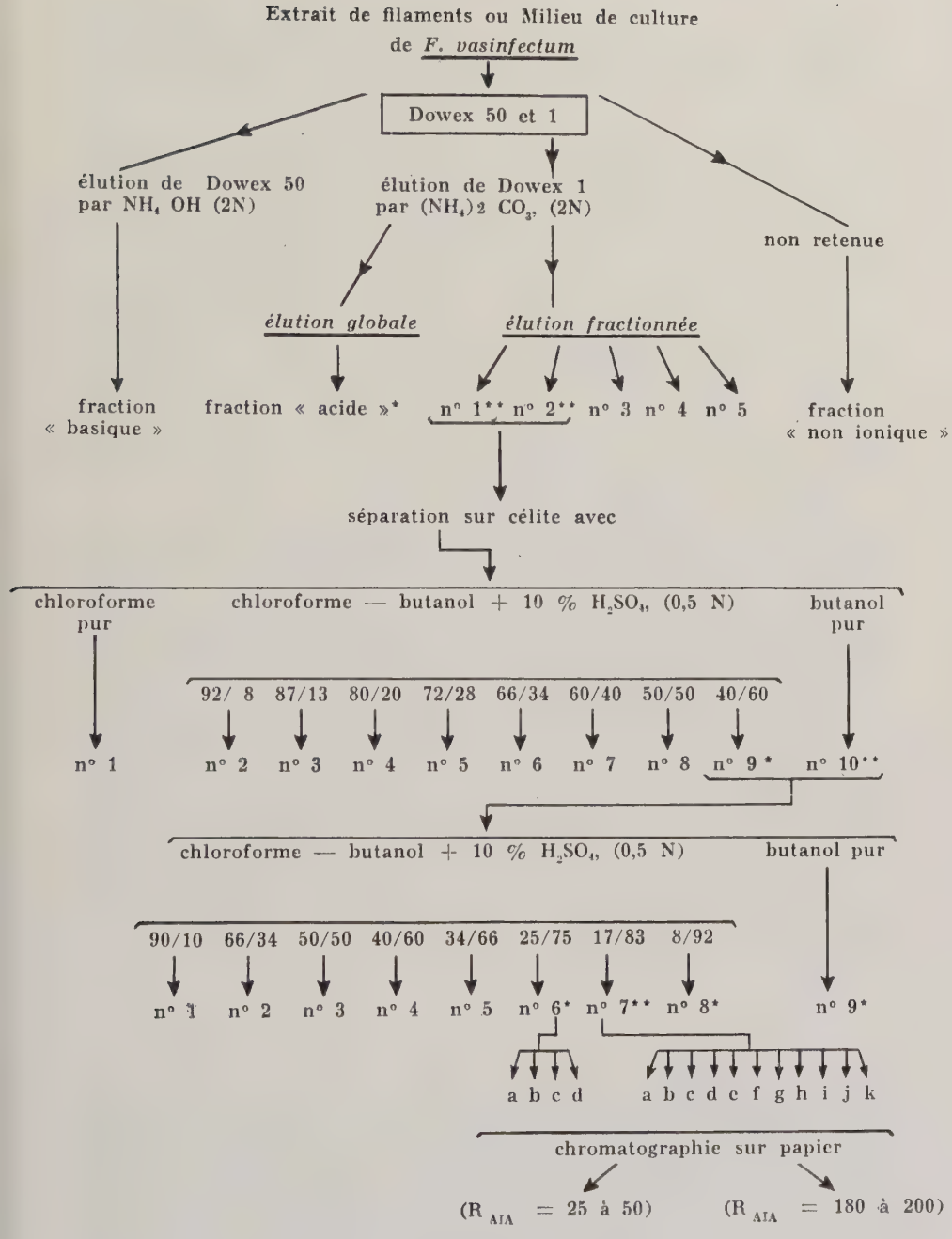


FIGURE 19

Fractionnement de l'extrait de filaments de F. vasinfectum *ou de son milieu de culture; * activité antiauxinique, ** activité antiauxinique très forte.*

au moins dans les limites des quantités utilisées (1 fragment ou 3 fragments de chromatogrammes ont la même action [1]).

Le tableau 17 illustre l'essentiel de ces données.

β) *L'extrait de filaments de* F. vasinfectum contient lui aussi dans la dernière fraction active isolée sur célite plusieurs substances légèrement inhibitrices ou inactives sur la croissance de *N. galligena,* associées au facteur antiauxinique et dont seule la chromatographie de partage sur papier a permis la séparation.

Ce facteur antiauxinique est le même que celui du filtrat de culture. Mais de plus, l'apparition, plus ou moins régulière d'ailleurs, d'une autre substance antiauxinique à Rf = 75 à 92 ou au $R_{A.I.A.}$ de l'ordre de 180 à 200 est aussi constatée. Ce deuxième facteur (facteur *Fusarium II*), moins actif que le premier dans son activité antiauxinique sur la croissance inhibée par l'A.I.A. de *N. galligena,* n'a pas été, non plus, identifié par les révélateurs des composés indoliques (tableau 17 *bis*).

Il va de soi que les deux facteurs isolés ne totalisent pas toute l'activité antiauxinique du milieu et des filaments de *F. vasinfectum.* Pour conduire cette recherche, j'ai été amenée à choisir plusieurs fois, parmi plusieurs parties, celle qui paraissait avoir une activité antiauxinique importante sur la croissance inhibée par l'A.I.A. de *N. galligena.* Il ne faut donc pas exclure l'existence possible d'autres facteurs.

En résumé, la recherche des facteurs antiauxiniques chez *F. vasinfectum* a abouti à l'isolement, principalement, d'une première substance qui migre dans les solvants de chromatographie des substances de croissance et dont la zone de Rf a pu être précisée. Ce facteur antiauxinique, actif à faible dose, est synthétisé dans les filaments et excrété dans le milieu de culture. Une seconde substance antiauxinique, migrant aussi dans les solvants de substances de croissance, a été décelée dans les filaments mais non dans le milieu de culture.

*
**

L'interaction en cultures simultanées sur milieux gélosés de *F. vasinfectum,* organisme résistant à l'A.I.A. exogène, et *N. galligena,* organisme dont la croissance est très inhibée par ce corps, est faible et tardive malgré la synthèse de quantités appréciables de « métabolites antiauxines » sécrétés par l'organisme résistant. Il est alors prouvé que sous d'autres conditions, les deux organismes seraient capables « d'inter-agir »; en effet, *N. galligena* poussant sur les filtrats des milieux de culture non gélosés de

(1) Voir notes page 72.

F. vasinfectum à qui l'A.I.A. et la gélose ont été ensuite ajoutés n'a pas sa croissance inhibée. Les « métabolites antiauxines » sécrétés seraient différents de la biotine ou du corps X formés par *R. nigricans;* de plus, ils ne diffusent pas, ou très faiblement, dans la gélose. Leur action pourrait être diminuée par la présence simultanée d'autres substances, également produites par *Fusarium,* qui, elles, sont inhibitrices de la croissance de *N. galligena.* Enfin, les faits précités montrent aussi que l'interaction *N. galligena* — *F. vasinfectum* ne peut être attribuée à la grande capacité de destruction de l'auxine par *F. vasinfectum.* Un tel type d'interaction où plusieurs facteurs s'opposent à sa manifestation sous certaines conditions, peut être qualifié de « *non apparent* » par opposition à l'interaction « *apparente* » de *R. nigricans* — *N. galligena.*

En définitive, l'étude de ces deux types d'interaction a permis de constater que :

— le degré d'interaction de deux organismes en présence d'auxine ne dépend pas seulement de la présence ou de l'absence de « métabolites antiauxines » synthétisés et sécrétés par l'organisme qui est résistant;

— il peut exister des « métabolites antiauxines » *apparemment* inactifs sous certaines conditions, à cause entre autres de leur difficulté de migration ou de diffusion dans le système colloïdal qui les sépare de leur point ou centre d'action.

DEUXIEME PARTIE

COMMENT *NECTRIA GALLIGENA* DEVIENT RÉSISTANT A L'A.I.A. EXOGÈNE AU COURS DES INTERACTIONS DE CROISSANCE

L'étude des deux types d'interaction en présence de doses d'auxine exogène, inhibitrices de la croissance de *N. galligena* m'a permis d'établir :

1° *Au sujet des organismes résistant à l'A.I.A. :* en présence de *F. vasinfectum* l'auxine exogène peut disparaître massivement, au contraire en présence de *R. nigricans* elle demeure inchangée dans sa quasi-totalité. Ainsi, au cours de l'interaction la plus apparente, le champignon résistant, *R. nigricans,* intervient par la sécrétion de substances antiauxiniques sans détruire l'A.I.A. Mais des substances antiauxiniques sont aussi synthétisées par le second champignon résistant, *F. vasinfectum;* leur action est freinée ou même stoppée par la mise en jeu d'autres facteurs qui semblent être de nature physique et biochimique et rendent moins apparente l'interaction possible.

2° N. galligena, *organisme sensible à l'A.I.A.*, ne fait pas subir de dégradation à l'A.I.A. exogène lorsqu'il est cultivé isolément.

Par quel moyen *N. galligena* devient-il donc résistant aux doses élevées d'A.I.A. en présence des substances antiauxiniques sécrétées par les deux autres champignons ? Est-il capable, sous cette dernière condition, de détruire ou de dégrader l'A.I.A. exogène, ou bien les substances antiauxiniques des champignons résistants, synthétisées dans les filaments et excrétées dans les milieux de culture, agissent-elles à certains niveaux de son métabolisme ?

Nous analyserons successivement ces deux aspects du problème.

CHAPITRE I

LES SUBSTANCES SECRETEES PAR LES CHAMPIGNONS RESISTANTS RENDENT-ELLES *N. GALLIGENA* CAPABLE DE DEGRADER L'A.I.A. EXOGENE ?

Dans ce but, j'ai entrepris deux types d'expérimentation. D'une part, j'ai suivi, par dosage colorimétrique et par chromatographie, l'évolution de l'A.I.A. au cours de la levée d'inhibition de croissance de *N. galligena* par les facteurs de *F. vasinfectum* et *R. nigricans*. D'autre part, j'ai voulu connaître le devenir de l'auxine dans les cellules de l'organisme test au cours de cette même levée d'inhibition, et ceci dans les conditions mêmes de culture du champignon. Pour cela, j'ai utilisé une méthode indirecte en remplaçant l'A.I.A. par une auxine non naturelle, qui ne subit pas ou que très peu de destruction enzymatique, l'acide α-naphtyl-acétique (A.N.A.). J'ai alors éprouvé l'action de l'A.N.A. dans le milieu de base où était ensemencé *N. galligena*, en fournissant simultanément les facteurs antiauxiniques de *F. vasinfectum* ou de *R. nigricans*.

I. — EVOLUTION DE L'A.I.A. EXOGENE AU COURS DE LA LEVEE D'INHIBITION CHEZ *N. GALLIGENA* PAR LES FACTEURS SECRETES PAR *F. VASINFECTUM* ET *R. NIGRICANS*

Nous avons vu (p. 42) que 0,24 mg/l d'extrait sec de filaments de *R. nigricans* ainsi que 0,6 mg/l du résidu sec provenant du milieu de culture sur lequel s'est développé ce champignon, tout comme 0,1 mg/l de biotine, sont capables de lever entièrement l'inhibition provoquée par 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. exogène, tout en n'ayant aucun effet accélérateur sur la croissance de *N. galligena*. J'ai démontré également que 0,27 mg/l d'extrait sec de filaments de F. *vasinfectum* ou 3 mg/l du milieu de culture où a poussé cet organisme ou bien encore le facteur *Fusarium I* provoquent la même action.

Au cours des présents essais, les mêmes doses de substances antiauxiniques de *Rhizopus* ou de *Fusarium* sont ajoutées dans

le milieu de base en présence de 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. Comme dans les expériences précédentes, les dosages d'A.I.A. et les analyses chromatographiques sont effectués le jour de l'ensemencement et après 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 et 15 jours de croissance de *N. galligena*.

L'évolution dans le temps de l'A.I.A. exogène en présence ou non des facteurs antiauxiniques trouvés dans l'extrait de filaments ou le résidu sec du milieu de culture des champignons résistants, est étudiée comparativement dans les milieux non ensemencés ou ensemencés par le test *N. galligena*. La figure 20 et le tableau 18 en résument les faits essentiels. Les déterminations de la croissance pondérale des cultures sont faites pour contrôle les 8e et 15e jours après l'ensemencement.

A. — A.I.A. CONTENU DANS LA FRACTION ETHEREE

1° *Dans les milieux non ensemencés* renfermant les extraits de filaments de *R. nigricans* ou de *F. vasinfectum* ou les résidus secs des milieux bruts sur lesquels se sont développés l'un ou l'autre des deux champignons, ou bien encore le facteur *Fusarium I* ou la biotine, l'A.I.A. subit une très faible destruction; celle-ci n'est pas plus grande que la destruction qui se produit dans le milieu de base contenant seulement l'A.I.A. On remarque même que lorsqu'il y a adjonction des divers « métabolites antiauxines », la disparition d'A.I.A. dans le temps est moins accusée. Après 15 jours on trouve environ 49 % d'A.I.A. dans les séries contenant les extraits de filaments ou les résidus du milieu, contre 44 % dans les séries témoins.

2° *Lorsque* N. galligena *est ensemencé,* la présence ou non des facteurs antiauxiniques de *R. nigricans* ou *F. vasinfectum* ne modifie pas sensiblement l'évolution, au cours du temps, de l'A.I.A. exogène. Il semble là aussi que l'adjonction des extraits empêche en partie la disparition progressive de l'A.I.A. : après 15 jours, on trouve environ 45 % d'A.I.A. dans les séries ensemencées contenant les extraits ou milieux de champignon, 44 % dans celles avec biotine et 39 % dans celles sans extrait. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Nysterakis (1961) utilisant la biotine comme antagoniste de l'action inhibitrice de l'A.I.A. chez *N. galligena* et dosant l'A.I.A. total au cours de la croissance de ce champignon.

3° De plus, *l'analyse chromatographique des extraits éthérés* dans les séries ensemencées avec *N. galligena,* comme dans celles qui ne le sont pas, indique que ce qui a été dosé est uniquement de l'A.I.A.; l'intervention des extraits de filaments ou du milieu de culture de *R. nigricans* et *F. vasinfectum,* ou encore du facteur *Fusarium I* ou de la biotine n'a donné naissance à aucune substance indolique nouvelle.

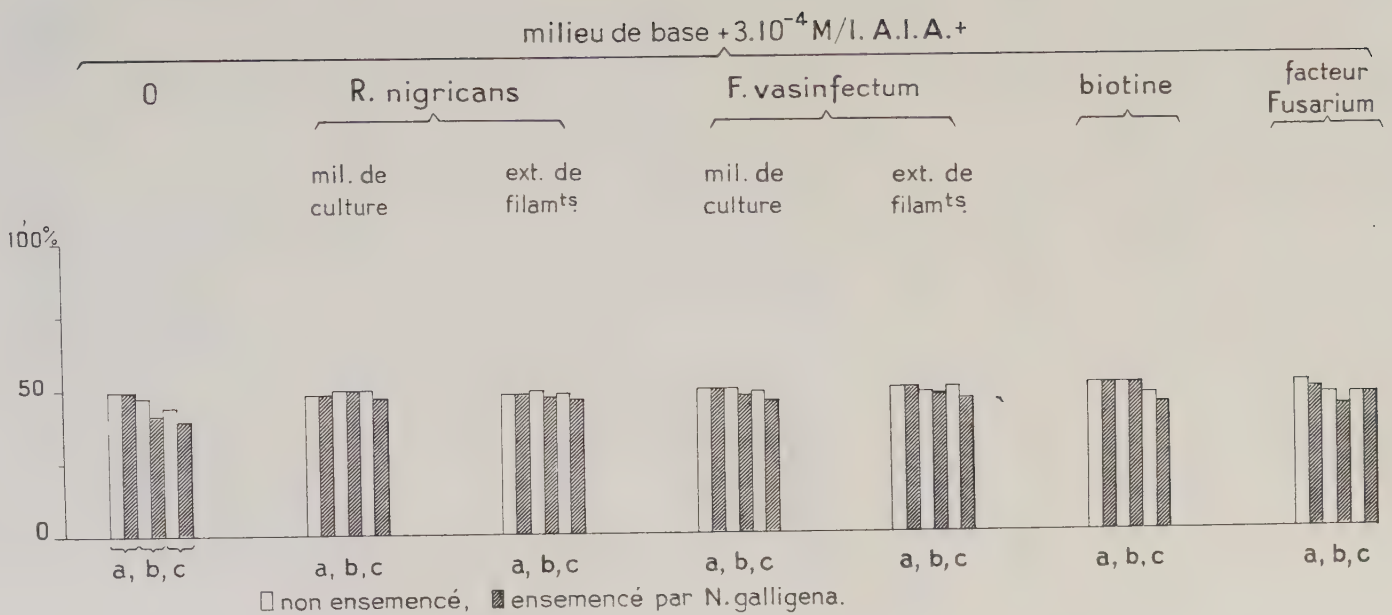


FIGURE 20

Quantité d'A.I.A. dans les extraits éthérés provenant du milieu de base gélosé auquel on ajoute de l'A.I.A. et différentes substances antiauxiniques (100 = *quantité initiale d'A.I.A. exogène; temps :* 0 = *a*, 8e *jour* = *b*, 15e *jour* = *c*).

TABLEAU 18

Quantité de composés indoliques (exprimée en mg/l d'A.I.A. et en % : 100 = quantité initiale d'A.I.A. exogène, après stérilisation) présente dans différents substratums contenant les substances antiauxiniques et l'A.I.A. exogène lorsque N. galligena *a été ou non ensemencé (E : dans l'extrait éthéré; R : quantité restant dans la gélose après extraction éthérée).*

		Jours	A.I.A. (M/l) DONNE									
			0			3.10^{-4}						
			E	R	Total	E		R		Total		
			mg	mg	mg	mg	%	mg	%	mg	%	
T	non ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	22	47,3	24	51,6	46	99	
		15	0	0	0	20,5	44	23,5	50,5	44	95	
	ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	19,5	42	25,5	54,8	45	96,8	
		15	0	traces	traces	18,5	39,8	23,5	50,5	42	90,3	
T + milieu *F. vasinfectum*	non ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46	99	
		15	0	0	0	22	47,3	23	49,5	45	96,8	
	ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	22	47,3	23,5	50,5	45,5	98	
		15	0	traces	traces	21,5	46,2	22	47,3	43,5	93,5	
T + extrait filaments *de F. vasinfectum*	non ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46	99	
		15	0	0	0	23	49,5	23	49,5	46	99	
	ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100	
		8	0	0	0	22	47,3	23,5	50,5	45,5	98	
		15	0	traces	traces	21,5	46,2	22,5	48,4	44	94,6	

T + milieu *R. nigricans*	non ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	24	51,6	46,5	100
		8	0	0	0	23	49,5	23	49,5	46	99
		15	0	0	0	23	49,5	23	49,5	46	99
	ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	24	51,6	46,5	100
		8	0	0	0	23	49,5	22,5	48,4	45,5	98
		15	0	traces	traces	22	47,3	22,5	48,4	44,5	95,7
T + extrait filaments de *R. nigricans*	non ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46	99
		8	0	0	0	23	49,5	23	49,5	46	99
		15	0	0	0	22,5	48,4	23	49,5	45,5	98
	ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46	99
		8	0	0	0	22	47,3	23,5	50,5	45,5	98
		15	0	traces	traces	21,5	46,2	23	49,5	44,5	95,7
T + facteur *Fusarium I*	non ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	51,5	46,5	100
		8	0	0	0	21,5	46,2	23	49,5	44,5	95,7
		15	0	0	0	21,5	46,2	21,5	46,2	43	92,4
	ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46	99
		8	0	0	0	19,5	42	24	51,6	43,5	93,5
		15	0	traces	traces	21,5	46,2	20,5	44	42	90,3
T + 0,1 mg/l *biotine*	non ensemencé	0	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46,5	100
		8	0	0	0	22,5	48,4	24	51,6	46,5	100
		15	0	0	0	21,5	46,2	23	49,5	44,5	95,7
	ensemencé	0	0	0	0	23	49,5	23,5	50,5	46,5	100
		8	0	0	0	22,5	48,4	23,5	50,5	46,5	100
		15	0	traces	traces	20,5	44	23,5	50,5	44	94,6

B. — A.I.A. RESTANT DANS LE MILIEU GELOSE APRES EXTRACTION ETHEREE

Comme dans les expériences précédentes avec *N. galligena* (p. 32) l'éther n'a pas entraîné tout l'A.I.A.; il en reste des quantités importantes dans la gélose, en général équivalentes à celles qui passent dans l'éther. La comparaison entre les séries ayant reçu ou non les extraits de filaments, les filtrats de milieu de culture de *R. nigricans* et *F. vasinfectum*, le facteur *Fusarium I* ou la biotine, n'a pas permis de remarquer de différences sensibles, et ceci que les cultures aient été ou non ensemencées avec *N. galligena*. Une évaluation semi-quantitative permet d'estimer cet A.I.A., non entraîné par une extraction à l'éther, à 50 % ± 3 de la quantité initiale d'A.I.A. apportée au milieu de culture. Notons enfin qu'aucune substance indolique autre que l'A.I.A. n'est visible.

De cet ensemble de résultats, il ressort que chez *N. galligena*, pour un milieu de base donné, *l'A.I.A. exogène n'a pas été détruit par l'intermédiaire de ses cellules même lorsque les extraits de filaments de* R. nigricans *et de* F. vasinfectum *ou leurs milieux de culture ont été ajoutés à ce milieu de base en même temps que l'A.I.A.*

II. — ACTION SUR LA CROISSANCE DE *N. GALLIGENA* DE L'ACIDE α-NAPHTYL-ACETIQUE SEUL OU EN PRESENCE DES SUBSTANCES ANTIAUXINIQUES DE *R. NIGRICANS* OU DE *F. VASINFECTUM*

Les expériences faisant appel à des méthodes chimiques nous ont fourni des éléments déjà probants pour écarter la supposition d'après laquelle l'interaction de deux champignons, en présence de doses inhibitrices d'A.I.A. pour l'un d'eux (ici, *N. galligena*) et au contraire, non inhibitrices pour l'autre (*R. nigricans* ou *F. vasinfectum*) serait due à la destruction de l'auxine exogène soit dans le milieu, soit dans les cellules de l'organisme test. Il est intéressant de confronter maintenant les données recueillies avec celles que va nous fournir la méthode biologique choisie ici.

L'acide α-naphtyl-acétique, depuis les recherches de Zimmermann, Hitchcock et Wilcoxon (1936), Irwine (1938) et Koepfli, Thimann et Went (1938), a fait l'objet de très nombreux travaux. L'emploi de nombreux tests, tels que les racines de blé et de lin, les segments de coléoptiles d'avoine ou d'épicotyles de pois, etc..., notamment par Aberg (1950, 1951, 1954, 1957), Hansen (1954), Muir et Hansch (1953), Burström (1955), a mis essentiellement en évidence la très grande similitude d'action de ce composé avec l'A.I.A. Quelques légères différences concernant par exemple les interactions des deux auxines avec la gibberelline chez *Helianthus* (Hasman et Bara, 1961) sont cependant à noter. Par ailleurs, on sait que l'acide α-naphtyl-acétique, au contraire de l'A.I.A.

et d'autres auxines synthétiques telles que le 2,4-D (Dhillon et Lucas, 1950; Eames, 1950; Mac Ilrath et Ergle, 1953; Ray, 1958, etc...) ne subit pas ou subit très faiblement une destruction enzymatique chez les différents organismes utilisés. Pour ces deux raisons, il était particulièrement intéressant de savoir si les différents facteurs provenant des mycéliums et filtrats de cultures de champignons résistants à l'A.I.A. exogène, et se comportant en antagonistes de l'action inhibitrice de l'A.I.A. chez *N. galligena*, sont ou non capables de s'opposer aussi à l'action de l'acide α-naphtyl-acétique sur la croissance de *N. galligena*. Autrement dit,

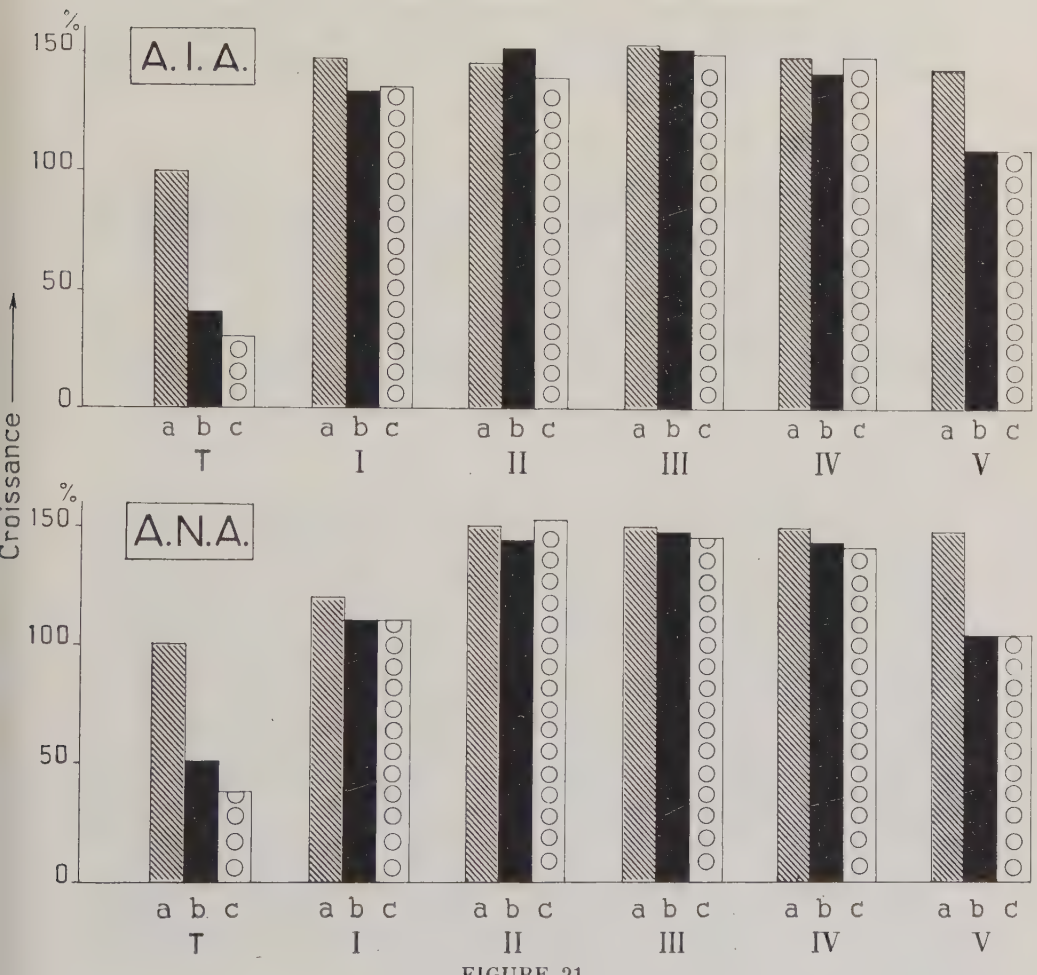


FIGURE 21

Croissance de N. galligena *sur milieu de base (T) en présence d'A.I.A. ou d'A.N.A. aux doses de* 0, 1,5 *et* 3.10^{-4} *M/l (a, b, c) auquel on ajoute en plus :* 0,1 *mg/l de biotine (I);* 0,24 *mg/l d'extrait de filaments de* R. nigricans *(II); le milieu sur lequel s'est développé* R. nigricans *(III);* 0,27 *mg/l d'extrait de filaments de* F. vasinfectum *(IV); le milieu sur lequel s'est développé* F. vasinfectum *(V).*

dans le cas où l'antagonisme établi entre A.I.A. et les sécrétions de *R. nigricans* et *F. vasinfectum* serait dû à une activation des systèmes auxine-oxydases de *N. galligena,* un tel antagonisme ne devrait pas se produire lorsque, à la place de l'A.I.A., l'A.N.A. est fourni à *N. galligena.*

J'ai donc ajouté ou non au milieu de base, soit 1,5 à 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., soit 1,5 à 3.10^{-4} M/l d'A.N.A. Ces séries sont complétées par des doses croissantes, d'une part, d'extraits de filaments de *R. nigricans* (0,24 à 2,4 mg/l) ou de *F. vasinfectum* (0,27 à 2,7 mg/l), d'autre part, du résidu sec des milieux sur lesquels se sont développés l'un ou l'autre des deux champignons en question. Puis *N. galligena* est ensemencé. La figure 21 indique les valeurs de croissance exprimées en pour cent par rapport au témoin (T = 100 sans extrait et sans A.I.A. ni A.N.A.).

Ces essais montrent que :

1° Au même titre que A.I.A. et à des concentrations sensiblement égales, l'A.N.A. provoque l'inhibition de croissance de *N. galligena.* Ces résultats sont en accord avec ceux de Crowdy (1947) qui utilisait des doses voisines de 6.10^{-4} M/l d'A.N.A.

2° Les extraits de filaments de *R. nigricans* et ceux de *F. vasinfectum* tout comme les milieux de culture sur lesquels se sont développés ces deux champignons, lèvent entièrement l'inhibition de croissance aussi bien due à l'A.N.A. qu'à l'A.I.A.

*
**

Bref, l'étude des modalités de la levée d'inhibition de croissance de *N. galligena* provoquée par l'A.I.A., sous l'action de substances antiauxiniques sécrétées par *R. nigricans* et *F. vasinfectum* a été effectuée par deux méthodes différentes. La méthode directe d'évaluation de la quantité d'A.I.A. dans le substratum, et la méthode indirecte où l'A.N.A. remplaçait l'A.I.A. dans son action inhibitrice, ont fourni des résultats entièrement concordants. Les différents facteurs antiauxiniques n'interviennent pas en provoquant la destruction de l'A.I.A. dans le milieu et les cellules du test *N. galligena.* La première hypothèse expliquant la levée d'inhibition auxinique par destruction simple de l'auxine ne peut donc être retenue. Les substances antiauxiniques sécrétées par les champignons résistants à l'A.I.A. exogène, paraissent agir autrement, peut-être en intervenant à des niveaux donnés du métabolisme de *N. galligena.* A ce titre, elles peuvent être considérées comme des « métabolites antiauxines » au sens de Nysterakis (1954 b).

CHAPITRE II

ETUDE COMPAREE DES METABOLISMES DE *N. GALLIGENA*, *R. NIGRICANS* ET *F. VASINFECTUM*, EN PRESENCE OU NON DE FORTES DOSES D'A.I.A. EXOGENE

Comment l'action de l'auxine sur la croissance des végétaux supérieurs se traduit-elle au niveau du métabolisme ? C'est en même temps poser la question de savoir dans combien de réactions participe l'auxine au cours de ses deux effets, accélérateur et inhibiteur, sur la croissance et quels rapports on peut établir entre ces deux aspects opposés du même processus.

Au cours de la croissance, l'apport de *doses accélératrices* d'auxine peut provoquer des changements métaboliques de divers ordres. L'amylolyse et la quantité de sucres réducteurs sont généralement augmentés, par exemple, dans les sections excisées de tige de tabac (Skoog et Robinson, 1950). Le taux des lipides diminue dans les premières phases d'allongement des coléoptiles d'*Avena*, comme l'ont montré Christiansen et Thimann (1950). Il se produit des perturbations de l'équilibre entre la dégradation des protéines et leur synthèse chez de nombreux tests (Christiansen et Thimann, 1950; Bonner, 1953). Mais le lien le plus étroit apparaît entre croissance et processus respiratoire, une stimulation de la croissance étant liée dans la plupart des cas à une stimulation de la respiration. L'action de l'auxine exige la présence d'oxygène et le fonctionnement des enzymes d'oxydation, de phosphorylation et de ceux contenant des liaisons SH (Léopold et Guernsey, 1953; Léopold et Price, 1956; Thimann, 1956 a; Pilet, 1961). Brunel-Capelle (1956), analysant l'importance des composés thiols dans le métabolisme par le test de décarboxylation de l'acide mésoxalique, envisage que des taux élevés de groupes SH caractérisent les organes ou parties d'organes connus pour être riches en auxines. Goas (1959) constate une forte activité des composés thiols non seulement au cours de la phase de multiplication cellulaire intense, mais aussi de la phase d'allongement cellulaire chez les coléoptiles de plusieurs graminées. Par ailleurs, une démonstration des rapports étroits entre respiration et croissance a été fournie par Pilet et Kobr (1959) montrant que le maximum d'absorption d'oxygène par les racines de *Lens* se situe dans la zone qui renferme la plus forte concentration d'auxines endogènes et qui a la plus forte crois-

sance. On peut admettre avec Thimann que la croissance utilise une partie de l'énergie nécessaire à la respiration et que les nombreux changements métaboliques constatés ne seraient que les conséquences indirectes d'une réaction essentielle ou « master reaction » de l'auxine, qui pourrait se situer au point de jonction des processus de respiration et de croissance, donc peut-être au niveau de la synthèse de certains acides organiques. Les strictes exigences de configuration moléculaire pour qu'un corps joue le rôle d'une bonne auxine appuient fortement l'hypothèse que l'auxine provoque une accélération de croissance en participant à une réaction donnée.

Les renseignements sur le mode d'action de *doses d'auxine inhibitrices* de la croissance apparaissent moins complets.

Des quantités élevées de 2,4-D provoquent chez le haricot une disparition des différentes fractions hydrocarbonées, y compris des sucres réducteurs, ainsi qu'une accumulation des acides aminés et des protéines (Sell et coll., 1949). Mais chez *Taraxacum dens-leonis* on trouve un taux élevé de sucres réducteurs sous l'action du même 2,4-D (Rasmussen, 1947). Rhodes et coll. (1950) constatent chez la tomate une baisse progressive de la quantité totale d'azote sous l'action de doses croissantes d'acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique, ainsi d'ailleurs qu'une baisse partielle des taux de phosphate et surtout de potassium. Cette diversité de résultats peut s'expliquer si l'on considère que les processus analysés n'ont qu'un rapport assez indirect avec l'action principale de l'auxine. Où se situerait le niveau d'action de l'auxine dans son effet inhibiteur de la croissance ? De nombreux chercheurs considèrent que l'action accélératrice et l'action inhibitrice due à l'auxine sur la croissance sont les deux aspects d'une même fonction. D'autres au contraire, établissent une distinction entre l'accélération qui ferait appel à une fonction métabolique de l'auxine, et l'inhibition où l'auxine serait engagée dans une ou plusieurs fonctions distinctes de la précédente. Nysterakis (1953 a, b, 1954 a, b, c) avait émis l'hypothèse que les molécules d'A.I.A. en excès empêchent l'utilisation d'un métabolite essentiel, distinct de ceux avec lesquels l'auxine se combine pour stimuler la croissance. Cet auteur préconise alors l'utilisation de végétaux inférieurs comme les champignons, pour aborder certains problèmes de physiologie tels que ceux soulevés par le concept « métabolites antagonistes » développé par Roblin (1946 et 1949) après les expériences fondamentales de Woods et Fildes (1940) et de Woods (1940).

Pour éprouver ces différentes hypothèses, la fidélité du test *N. galligena* et la simplicité relative des phénomènes d'inhibition et de levée d'inhibition résultant de la non-destruction de l'auxine exogène rendaient possible une étude précise des modifications métaboliques provoquées par l'inhibition de croissance due à l'A.I.A. D'autre part, il était tentant de voir si le renversement de cette inhibition de croissance par divers « métabolites anti-auxines » était concomitant d'un rétablissement éventuel des processus métaboliques modifiés par l'A.I.A.

En conséquence, j'ai voulu comparer en cultures isolées dans un milieu contenant ou non l'A.I.A., le métabolisme des champignons résistants à de fortes doses d'auxine exogène, ou au contraire, de ceux très sensibles à cette action. J'ai alors étudié principalement les acides organiques et, secondairement, les acides aminés (1) qui pouvaient paraître les plus directement en cause. Sous ce point de vue, seront successivement étudiées les réactions de *N. galligena,* sur milieu témoin, au cours de l'inhibition de sa croissance par l'auxine et au cours de la levée de cette inhibition par les substances antiauxiniques décelées chez *R. nigricans* et *F. vasinfectum.* Puis, les cas de *R. nigricans* et de *F. vasinfectum,* soumis ou non à des doses d'A.I.A. inhibitrices de la croissance de *N. galligena* leur seront confrontés.

I. — CAS DE *N. GALLIGENA*

A. — METABOLISME EN PRESENCE OU NON D'A.I.A. EXOGENE

L'organisme est ensemencé sur milieu de base habituel non gélosé (2), avec ou sans A.I.A. à la concentration de 3.10^{-4} M/l. Les analyses sont effectuées après 15 jours de culture :

1° L'ensemble des faits concernant les *acides organiques* contenus dans les *filaments* et le *milieu de culture* montre :

a) Les cultures poussant sur *milieux témoins* produisent principalement de l'acide malique et de l'acide citrique (33 % d'acide malique dans les filaments et 28 % dans le milieu; 32 % d'acide citrique dans les filaments et 24 % dans le milieu), des quantités notables d'acide fumarique (17 % dans les filaments et 25 % dans le milieu) et succinique (17 % dans les filaments et 19 % dans le milieu); mais relativement très peu d'acide lactique et d'acide glycolique (tableau 19). Il faut remarquer aussi que compte tenu des variations d'une expérience à l'autre, les quantités de chacun des acides organiques décelés présentent de faibles différences de taux entre le milieu et les filaments. En effet, si l'on évalue la teneur des acides en milligrammes par gramme de filaments secs on remarque, par exemple, que les taux sont pour l'acide malique de 2,1 dans les filaments et de 2,4 dans le milieu,

(1) Cf., p. 64 (2).

(2) *N. galligena* pousse très lentement en milieu liquide et sa culture sur un milieu gélosé qu'il aurait fallu ensuite liquéfier, aurait rendu difficilement interprétables les analyses. Aussi ai-je constitué un substratum solide avec du sable assez gros, chimiquement inerte, provenant de la Station agronomique d'Antibes. Ce sable était traité par lavages successifs et prolongés à l'acide chlorhydrique et au mélange sulfochromique. J'ai ajouté dans chaque erlenmeyer 30 ml de milieu de base de telle manière qu'il affleure à la surface du sable. Sous ces conditions, *N. galligena* s'est développé aussi bien que s'il avait poussé sur milieu gélosé. A la fin de l'expérience, je pouvais alors retirer les filaments qui formaient un feutrage continu. L'emploi de billes de verre au lieu de sable m'a donné des résultats identiques.

pour l'acide citrique de 1,9 pour les filaments et le milieu. On peut noter aussi que l'acide fumarique est l'acide qui est le plus fortement libéré dans le milieu.

TABLEAU 19

Quantités d'acides organiques, présents dans les filaments et excrétés dans le milieu, chez N. galligena *cultivé pendant 15 jours sur milieu de* Westergaard et Mitchell *modifié (% = proportions relatives des acides entre eux : 100 = total).*

	malique	citrique	succinique	fumarique	lactique	glycolique
Extrait de filaments de *N. galligena*						
% de l'ensemble des acides	33	32	17	17	traces	traces
µg par tache chromatographiée (correspondant à l'extrait d'une culture)	53	48	25	26	traces	traces
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec	2,1	1,9	1	1	traces	traces
Milieu de culture de *N. galligena*						
% de l'ensemble des acides	28	24	19	25	1	1
µg par tache chromatographiée (correspondant au milieu où a poussé une culture)	60	49	40	53	2	2
mg d'acides contenus dans le milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs	2,4	1,9	1,6	2,1	0	0

b) Par contre, *en présence d'A.I.A.*, j'ai pu mettre en évidence que les extraits de filaments et les milieux de culture de *N. galligena* ne contiennent *aucun des acides qui se forment dans les cultures poussant sur milieu témoin* (tableau 19 *bis*). Il a fallu utiliser des extraits de filaments 40 fois plus concentrés pour arriver à déceler quelques traces d'acides malique et citrique et même avec une telle concentration, les quatre autres acides faisaient entièrement défaut (figure 22).

Ainsi, en même temps que l'A.I.A. inhibe la croissance de N. galligena *il bloque fortement la formation des acides malique et citrique et plus encore celle des acides fumarique, succinique, lactique et glycolique.*

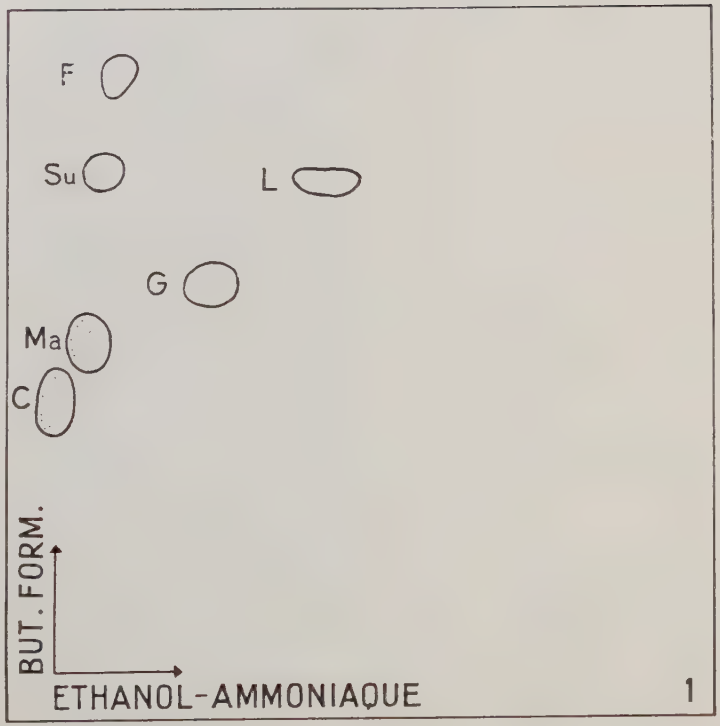
TABLEAU 19 *bis*

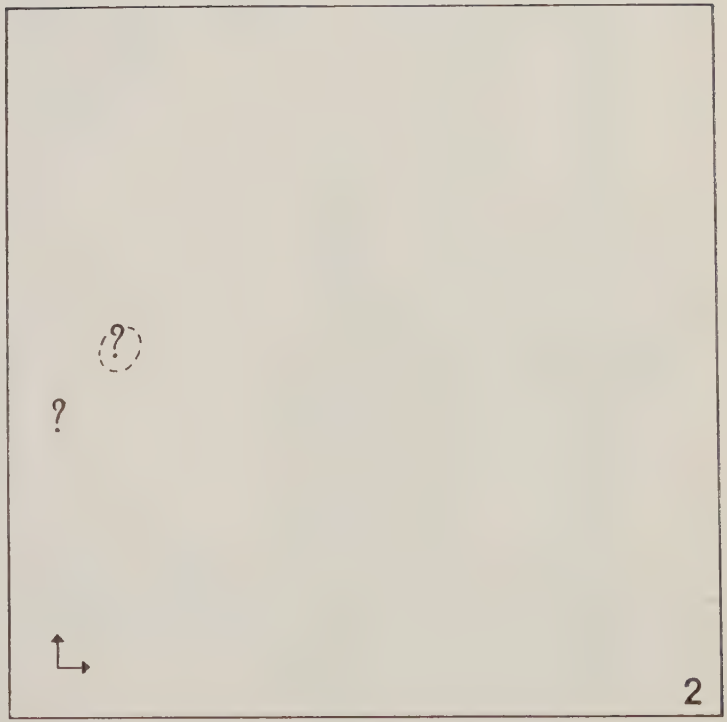
Synthèse et excrétion d'acides organiques chez N. galligena *au cours de l'inhibition auxinique de la croissance.*

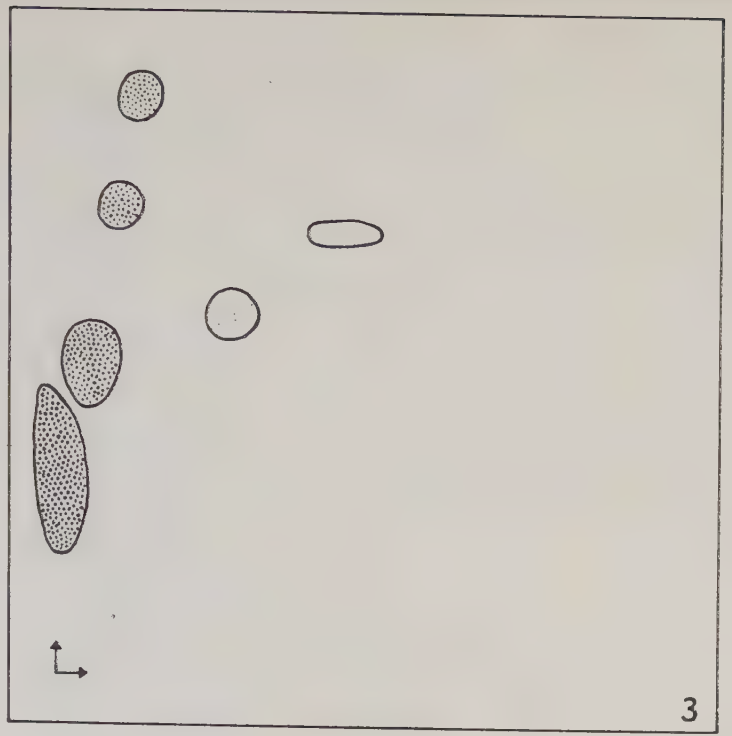
A.I.A. (M/l)	0	3.10^{-4}
Poids sec des filaments (en mg/culture)	25	9
mg d'acides contenus dans les *filaments* qui représentent un gramme en poids sec :		
malique	2,1	0
citrique	1,9	0
succinique	1	0
fumarique	1	0
lactique	traces	0
glycolique	traces	0
mg d'acides contenus dans le *milieu* où l'on a récolté un gramme de filaments secs :		
malique	2,4	0
citrique	1,9	0
succinique	1,6	0
fumarique	2,1	0
lactique	0	0
glycolique	0	0

2° En ce qui concerne la recherche des *acides aminés et amides.*

J'ai mis en évidence sur *milieux témoins,* dans les filaments de *N. galligena* et dans leur milieu de culture, la présence importante d'alanine (29 % dans les filaments et 22 % dans le milieu de culture), de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, de l'acide γ-amino-butyrique, des sérine, glycocolle, thréonine, valine, leucines, lysine, arginine, dont les proportions relatives varient entre 5 et 10 %. Les proline, phényl-alanine, glutamine sont encore appréciables; enfin, des traces de citrulline, de cystéine, d'asparagine, d'histidine et de tyrosine sont visibles (tableau 20). En outre, si on évalue leur teneur en milligrammes par gramme de filaments secs on remarque que, pour la plupart de ces corps, leur taux est souvent plus important dans l'extrait de filaments que dans le milieu de culture.


F
Su
L
G
Ma
C
BUT. FORM.
ETHANOL-AMMONIAQUE
1


?
?
2



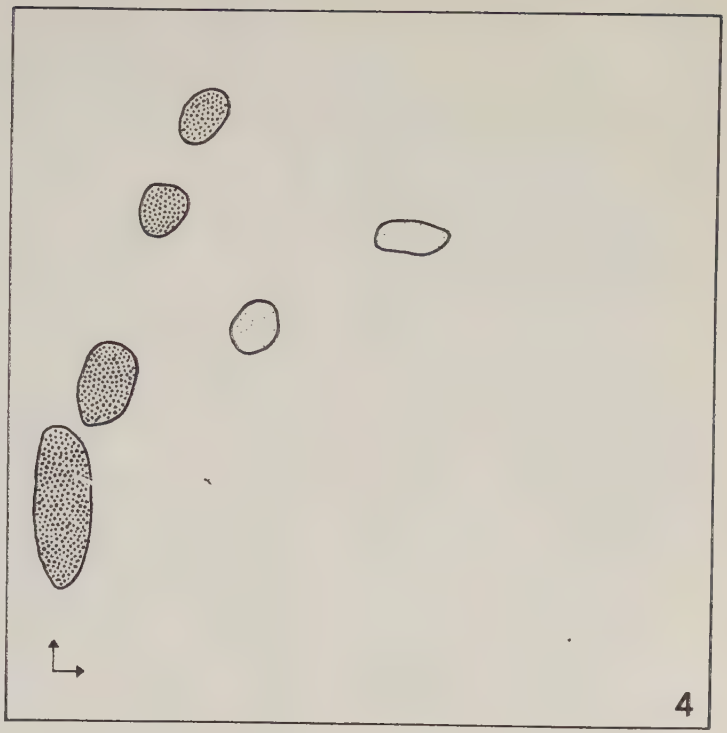


FIGURE 22

Chromatogrammes bidimensionnels des acides organiques de N. galligena *poussant sur :*

Milieu témoin : 1; *milieu témoin* + *A.I.A.* (3.10^{-4} *M/l*) *:* 2; *milieu témoin* + ***biotine*** (0,1 *mg/l*) *:* 3; *milieu témoin* + *A.I.A.* + *biotine :* 4.

(F) : acide fumarique; (Su) : acide succinique; (L) : acide lactique; (Ma) : acide malique; (C) : acide citrique; (G) : acide glycolique. Les taches des chromatogrammes proviennent d'extraits obtenus à partir du même poids de filaments de N. galligena. *La trace d'acide malique dans le chromatogramme* 2 *a été obtenue en concentrant* 40 *fois plus les quantités utilisées pour les chromatogrammes* 3 *et* 4.

TABLEAU 20

Substances aminées contenues dans les filaments et excrétées dans le milieu de culture de N. galligena.

	Filaments			Milieu		
	% de l'ensemble des substances aminées	µg par tache chromatographiée	p.p.m.	% de l'ensemble des acides	µg par tache chromatographiée	p.p.m.
alanine	29	10,9	440	22	3,7	150
a. glutamique	12	4,5	180	6		40
sérine	5	1,8	75	9		60
a. aspartique	5	1,8	75	9		60
a. γ-aminobutyrique	6	2,2	90	traces		
glycocolle	6	2,2	90	11		70
valine	6	2,2	90	9		60
arginine	5	1,8	75	7		50
thréonine	5	1,8	75	8		55
a. pipécolique	0			0		
leucines	5	1,8	75	7		50
lysine	5	1,8	75	7		50
proline	2			1		
tyrosine	traces			0		
histidine	traces			traces		
β-alanine	0			0		
asparagine	traces			0		
glutamine	3			traces		
citrulline	traces			traces		
cystéine	traces			0		
phénylalanine	2			traces		
éthanolamine	0			0		

De plus, lors de *l'adjonction au milieu de base* de doses *d'A.I.A.* inhibitrices pour la croissance de *N. galligena*, je n'ai pu constater de changements notables dans la qualité et la quantité des acides aminés susmentionnés par rapport à ceux trouvés dans les cultures témoins.

Cette présente expérimentation nous a donc permis de connaître certaines modifications métaboliques survenues au cours de l'inhibition de croissance de l'organisme sensible aux fortes doses d'A.I.A. exogène, soit, blocage de la formation de quelques acides organiques et continuation normale de la production des substances aminées.

Il s'avérait alors utile de savoir quelles transformations peuvent se produire dans le métabolisme de *N. galligena* lors de l'intervention des « métabolites antiauxines » capables de redonner une croissance normale à l'organisme inhibé.

B. — ACTION DES SUBSTANCES ANTIAUXINIQUES SUR LA FORMATION DES ACIDES ORGANIQUES DE *N. GALLIGENA* AU COURS DU RETABLISSEMENT DE LA CROISSANCE INHIBEE PAR L'A.I.A.

Pour étudier cette action, *N. galligena* a été ensemencé sur milieu de base contenant ou non A.I.A. (3.10^{-4} M/l) et enrichi d'extraits de filaments ou de milieux de culture de *R. nigricans* et *F. vasinfectum*, fournis à des doses sans action accélératrice propre sur la croissance. Au cours de cette expérimentation, j'ai tenu aussi à donner à *N. galligena*, dont la croissance était inhibée par A.I.A., des substances provenant de l'extrait de filaments ou des milieux de culture de ces champignons, isolées à l'état cristallisé ou chromatographiquement et déjà caractérisées en tant que « métabolites antiauxines ». C'est ainsi que la biotine (0,1 mg/l) et le facteur *Fusarium I* (0,8 mg/l) ont été additionnés au milieu de base en même temps que A.I.A.

La recherche des acides organiques dans les filaments de *N. galligena* a eu lieu 15 jours après l'ensemencement. Les données sont consignées dans le tableau 21.

1° Les résultats obtenus en présence d'*extraits de filaments* de *R. nigricans* ou *F. vasinfectum* ou de *leurs milieux* de culture permettent de voir que :

— en ce qui concerne *les extraits de filaments*, la levée d'inhibition de croissance est concomitante d'un rétablissement des synthèses en acides organiques chez *N. galligena*. Ces extraits semblent même stimuler la formation des acides malique, citrique et fumarique normalement synthétisés par le champignon poussant sur milieu témoin;

— en ce qui concerne les *milieux de culture*, ils restaurent le pouvoir de formation des acides organiques chez *N. galligena* en même temps qu'une croissance normale. Le milieu de culture de *R. nigricans* est plus actif que celui de *F. vasinfectum*.

2° Les résultats obtenus en présence de biotine et du facteur *Fusarium I* mettent également en évidence qu'a lieu, simultanément chez le champignon test inhibé, une reprise de la croissance et de la production d'acides organiques. On remarque même dans

TABLEAU 21

Corrélation établie entre croissance pondérale et teneur en acides organiques des filaments du test N. galligena, *lorsque ce champignon est cultivé en présence d'A.I.A. et de divers « métabolites antiauxines »* (*F.v.* : F. vasinfectum : *R.n.* : R. nigricans).

A.I.A.	0							3.10^{-4} M/l						
Composés ajoutés	0	Biotine	milieu F.v.	Ex. fil F.v.	Facteur F.v.	milieu R.n.	Ex. fil R.n.	0	Biotine	milieu F.v.	Ex. fil F.v.	Facteur F.v.	milieu R.n.	Ex. fil R.n.
Poids sec des filaments (en mg/culture)	20	24	20	24	21	22	21	6	24	16	23	20	23	23
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec :														
malique	2	2,6	2,4	2,5	2	2,5	2,6	0	2,8	1,9	2,4	2,1	2,5	2,4
citrique	1,8	2,1	1,9	2	1,8	1,9	1,9	0	2,1	1,8	1,9	1,8	1,8	1,9
fumarique	1	1,1	0,9	1	1,1	1	1,2	0	1,1	0,8	1	0,9	1,1	1,0
succinique	1	1,1	0,9	0,9	1	1,2	1,0	0	1,1	0,7	1	1	1	1,2
lactique	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	0	traces	traces	traces	traces	traces	traces
glycolique	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	0	traces	traces	traces	traces	traces	traces

le cas de la biotine une légère augmentation dans les quantités d'acide malique, citrique, fumarique et succinique. En ce qui concerne les acides lactique et glycolique, leur taux est simplement rétabli. De plus, il faut noter que les cultures qui ont reçu de la *biotine* dans le milieu de base ne diffèrent pas des cultures poussées sur milieu de base + A.I.A. + biotine. Autrement dit, *la biotine, tout en rétablissant la croissance du micro-organisme et la production des acides organiques bloqués par A.I.A., se révèle aussi capable d'activer ici, par son action propre, la formation de quatre d'entre eux.*

L'ensemble de cette expérimentation prouve donc que chaque fois qu'il y a chez N. galligena *levée par les « métabolites anti-auxines » de l'inhibition de croissance due à l'A.I.A., il y a, en même temps, reprise normale des synthèses bloquées.*

II. — CAS DE *R. NIGRICANS*

Il m'a paru utile de voir, si les perturbations métaboliques provoquées par l'A.I.A. exogène chez *N. galligena,* intéressaient aussi *R. nigricans,* dont la croissance ne subit pas de modifications en présence de fortes doses de cette auxine. J'ai alors cultivé le champignon sur milieu de base, non gélosé, avec ou sans A.I.A. (3.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l). Après avoir déterminé la croissance pondérale de *R. nigricans,* j'ai voulu établir des comparaisons entre cette croissance et les variations et transformations métaboliques qui pourraient survenir à l'intérieur des cellules. A cet effet, lorsque les cultures sont âgées de 8 jours, les extraits de mycéliums et les filtrats des milieux de culture préalablement stérilisés à 100 °C/30 minutes sont fractionnés sur colonnes Dowex 50 et 1, comme il a déjà été indiqué dans les modes opératoires page 15. Les éluats recueillis pour chacune des fractions sont analysés par chromatographie de partage sur papier. Les résultats ci-après ont été obtenus :

1° Acides organiques contenus dans les filaments de *R. nigricans* ou dans leur milieu de culture.

a) Dans les *filaments* poussant sur *milieu témoin,* j'ai trouvé les acides malique, citrique, fumarique, succinique, lactique et glycolique, déjà signalés par Bernhauer et Thole (1936) ; Foster et coll. (1949 et travaux antérieurs) ; Barron et Ghiretti (1953). Dans mes expériences, les acides malique, citrique, succinique et fumarique sont en quantités appréciables, respectivement de 23, 26, 16 et 18 %. De plus, il m'a été possible d'en déceler d'autres, tels que les acides glutarique, glycérique, citramalique et quinique. Parmi ces derniers, seul l'acide glutarique est présent à environ 9 %, les autres étant simplement discernables (tableau 22).

Dans le milieu de culture, les résultats sont qualitativement les mêmes. Mais on constate le plus souvent une augmentation principalement dans les quantités d'acides malique, citrique, fumarique, par rapport à celles trouvées dans les filaments.

TABLEAU 22

Quantités d'acides organiques présentes dans les filaments et excrétées dans le milieu de R. nigricans. *Age des cultures 8 jours (% : proportions relatives des acides entre eux : 100 = total).*

	malique	citrique	succinique	fumarique	lactique	glycolique	glutarique	citramalique	glycérique	quinique
Extrait de filaments de R. nigricans										
% de l'ensemble des acides	23	26	16	18	1	2	9	2	traces	traces
µg par tache chromatographiée (correspondant à l'extrait de 0,1 culture)	62	70	43	48	2	5	24	5	traces	traces
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec	15,7	17,5	10,4	12	1	1,3	6	1,3	traces	traces
Milieu de culture de R. nigricans										
% de l'ensemble des acides	23	26	12	16	5	6	7	4	traces	traces
µg par tache chromatographiée (correspondant au milieu où a poussé 0,1 culture)	92	104	48	64	20	24	28	16	traces	traces
mg d'acides provenant du milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs	22,5	26	12	16	5	6	7	4	traces	traces

b) Dans les *filaments* poussant sur *milieu témoin + A.I.A.* (3.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l), les divers acides organiques se forment et leur teneur ne varie sensiblement pas par rapport à celle des mêmes acides organiques provenant des filaments du champignon développé sur milieu témoin, comme l'indique le tableau 22 *bis*. Lorsque cette étude chromatographique est pratiquée sur le *milieu de culture* où s'est développé le champignon, aucune variation n'est décelable par rapport à l'analyse effectuée à partir des milieux témoins.

TABLEAU 22 *bis*

Synthèse et excrétion d'acides organiques par R. nigricans *en présence ou non d'A.I.A. exogène.*

A.I.A. (M/l)	0	3.10^{-4}
Poids sec des filaments (en mg/culture)	40	41
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec :		
malique	15,7	16
citrique	17,5	17,5
succinique	10,4	10,8
fumarique	12,3	12
lactique	1	1,2
glycolique	1,3	1,5
glutarique	6	6
citramalique	1,6	1,3
glycérique	traces	traces
quinique	traces	traces
mg d'acides contenus dans le milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs :		
malique	22,5	23,5
citrique	26	27,5
succinique	12	13
fumarique	16	16,4
lactique	5,3	5
glycolique	6	6,5
glutarique	7	7
citramalique	4	4,5
glycérique	traces	traces
quinique	traces	traces

2° Substances aminées contenues dans les filaments de *R. nigricans* ou dans leur milieu de culture.

Sur milieu témoin, j'ai trouvé des quantités assez importantes d'un certain nombre d'acides aminés. Parmi ceux-ci, l'alanine *dans les filaments et le milieu de culture* est la plus abondante puisqu'elle représente 20 et 40 % de l'ensemble des acides aminés. L'acide glutamique représente 16 % dans les filaments et 15 % dans le milieu; les acides aspartique, pipécolique et γ-amino-butyrique, les sérine, glycocolle, arginine, thréonine, asparagine, glutamine, histidine, proline, valine et leucines, sont présents en quantités encore appréciables avec des proportions relatives allant de 1 à 10 %; enfin les lysine, tyrosine, β-alanine, cystéine, éthanolamine, sont juste identifiables (tableau 23).

TABLEAU 23

Substances aminées contenues dans les filaments et excrétées dans le milieu de culture de R. nigricans.

	Filaments			Milieu		
	% de l'ensemble des acides aminés et amides	µg par tache chromatographiée	p.p.m.	% de l'ensemble des acides aminés et amides	µg par tache chromatographiée	p.p.m.
alanine	20	6,1	1.540	40	4,4	1.110
glutamique	16	4,9	1.230	15	1,6	410
sérine	8	2,4	610	4	0,4	110
aspartique	7	2,1	540	5	0,5	135
γ aminobutyrique	1			2		
glycocolle	7	2,1	540	10	1,1	275
valine	1			2		
arginine	8	2,4	610	2		
thréonine	5	1,5	380	3		80
pipécolique	4		300	3		80
leucines	1			2		
lysine	traces			traces		
proline	5	1,5		1		
tyrosine	traces			traces		
histidine	4	1,2		2		
β-alanine	traces			traces		
asparagine	7	2,1	540	3	0,3	
glutamine	5	1,5	380	traces		
citrulline	0			0		
cystéine	traces			0		
phénylalanine	0			0		
éthanolamine	traces			0		

Exception faite pour l'alanine qui semble largement libérée dans le milieu de culture du champignon, on remarque qu'ici, le plus souvent, il y a davantage de substances aminées dans les filaments que dans les filtrats du milieu où s'est développé *R. nigricans.*

Sur milieu témoin + A.I.A. (3.10^{-4} *à* 3.10^{-3} *M/l*), je ne note guère de modifications qualitatives et quantitatives importantes, par rapport aux séries poussant sur milieu témoin, pour les acides aminés analysés à partir de l'extrait des filaments ou du milieu de culture.

Il apparaît donc que chez *R. nigricans,* de *fortes doses d'A.I.A. en valeurs absolues mais non inhibitrices de sa croissance, ne provoquent aucune modification appréciable dans la formation de nombreux acides organiques et de la plupart des acides aminés synthétisés et excrétés ensuite dans le milieu de culture.*

III. — CAS DE *F. VASINFECTUM*

Comme pour *R. nigricans,* et pour pouvoir établir des comparaisons avec les réactions de *N. galligena,* il était fructueux de connaître quelques traits du métabolisme de *F. vasinfectum* poussant en présence de doses élevées d'A.I.A. Le champignon est donc cultivé sur milieu de base liquide contenant 3 à 6.10^{-4} M/l d'A.I.A. Les traitements pour effectuer l'analyse chromatographique ont déjà été décrits. La croissance pondérale des cultures âgées de 15 jours est indiquée en même temps que la teneur en acides organiques et aminés des filaments de *F. vasinfectum* pour pouvoir observer corrélativement les modifications métaboliques qui auraient pu survenir.

Il ressort principalement de cette expérimentation :

1° *En ce qui concerne les acides organiques*

a) Sur milieu témoin, F. vasinfectum *forme dans ses filaments, et libère dans son milieu de culture, les acides organiques suivants :* citrique, malique, succinique, lactique, déjà connus depuis les travaux de Jefferson et Foster (1953). En particulier, les acides malique et succinique que j'obtiens sur milieu de Westergaard et Mitchell modifié, présentent des taux très importants (43 % d'acide malique dans les filaments et 14 % dans le milieu, 13 % d'acide succinique dans les filaments et 40 % dans le milieu). Mais je peux également déceler les acides citramalique (34 % dans les filaments et 11 % dans le milieu), citraconique (15 % dans le milieu), gluconique (9 % dans le milieu) et galacturonique (tableau 24). De plus, si on évalue les quantités d'acides organiques en milligrammes d'acides par gramme de filaments secs, on voit que les filaments renferment toujours moins d'acides organiques que le milieu de culture (tableau 24).

TABLEAU 24

Quantités d'acides organiques présentes dans les filaments et excrétées dans le milieu lorsque F. vasinfectum *se développe sur milieu de Westergaard et Mitchell modifié. (% : proportions relatives des acides entre eux : 100 = total).*

	malique	succinique	citramalique	citrique	lactique	citraconique	gluconique
EXTRAIT DE FILAMENTS DE *F. vasinfectum*							
% de l'ensemble des acides ..	43	13	34	8	traces	traces	traces
µg par tache chromatographiée, correspondant à l'extrait de 1/5e de culture ..	53	16	42	10	?	?	?
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec..	6	1,8	4,7	1,1	?	?	?
MILIEU DE CULTURE DE *F. vasinfectum*							
% de l'ensemble des acides ..	14	40	11	9	1	15	9
µg par tache chromatographiée, correspondant au milieu où a poussé 0,06 culture	63,6	182,2	50	41	4,5	68,2	41
mg d'acides provenant du milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs..	20,9	59,5	4,4	13,4	1,5	22,2	13,4

b) Sur *milieu témoin + A.I.A.*, on ne décèle pas de variation importante dans la composition et les teneurs en acides organiques des filaments et du milieu de culture de *F. vasinfectum* (tableau 24 *bis*).

TABLEAU 24 *bis*

Acides organiques présents dans les filaments et excrétés dans le milieu chez F. vasinfectum *cultivé en présence ou non d'A.I.A. exogène.*

A.I.A. (M/l)	0	3.10^{-4}
Poids sec des filaments en mg/culture	45	45
mg d'acides contenus dans les filaments qui représentent un gramme en poids sec :		
malique	0,6	0,6
succinique	1,8	2
citramalique	4,7	4,5
citrique	1,1	1
lactique	?	?
citraconique	?	?
gluconique	?	?
mg d'acides contenus dans le milieu où l'on a récolté un gramme de filaments secs		
malique	20,9	21
succinique	59,5	59
citramalique	4,4	4,5
citrique	13,4	13,6
lactique	1,5	1
citraconique	22,2	22
gluconique	13,4	13,5

2° *L'analyse des substances aminées* trouvées chez *F. vasinfectum* montre : *sur milieux témoins*, des quantités importantes d'alanine dans les filaments et le milieu de culture, soit environ 40 et 30 %, et d'acide glutamique (de l'ordre de 20 et 15 %). L'acide aspartique l'acide γ-aminobutyrique, les sérine, glycocolle, valine, arginine, ne dépassent pas 10 % et l'acide pipécolique, les thréonine, leucines, lysine, proline, tyrosine sont encore très nettement visibles; enfin, les histidine, β-alanine, asparagine, glutamine, citrulline sont à l'état de traces (tableau 25).

TABLEAU 25

Substances aminées contenues dans les filaments et excrétées dans le milieu de culture de F. vasinfectum.

	Filaments			Milieu		
	% de l'ensemble des acides aminés et amides	µg par tache chromato-graphiée	p.p.m.	% de l'ensemble des acides aminés et amides	µg par tache chromato-graphiée	p.p.m.
alanine	40	21,4	2.000	30	2,76	900
glutamique	22	11,7	1.200	15	1,3	450
sérine	7	3,7	350	3		89
aspartique	6	3,2	300	7	0,6	215
γ-aminobutyrique	5	2,6	250	6	0,5	180
glycocolle	3	1,6	150	21	1,9	645
valine	3	1,6	150	7	0,6	215
arginine	3	1,6	150	0		
thréonine	1			3		90
pipécolique	1			0		
leucines	1			3		90
lysine	1			1		
proline	1			3		
tyrosine	1			0		
histidine	traces			traces		
β-alanine	traces			0		
asparagine	traces			traces		
glutamine	traces			traces		
citrulline	traces			traces		
cystéine	0			0		
phénylalanine	0			0		
éthanolamine	0			0		

Si le champignon pousse sur *milieu témoin + A.I.A.* (3.10^{-4} à 6.10^{-4} M/l), les taux des substances aminées trouvés dans les filaments et le milieu de culture sont pratiquement identiques aux taux trouvés dans les filaments et le milieu du champignon poussant sur milieu de base seul.

Ainsi, comme pour R. nigricans, *les doses élevées d'A.I.A. n'ont provoqué chez* F. vasinfectum, *aucune modification dans la croissance et la formation de la plupart des acides organiques et aminés.*

*
**

En conclusion, l'analyse des métabolismes des trois champignons fait tout d'abord ressortir que :

— *sur milieu de base,* le nombre des acides organiques diffère selon les organismes (*R. nigricans* paraissant le plus riche des trois). Il y a dans tous les cas formation des acides malique, citrique, succinique, lactique; les acides fumarique et glycolique sont absents chez *F. vasinfectum.* Certains des acides nommés font partie des cycles di- et tricarboxyliques.

Les différences observées au sujet des substances aminées sont plus variées : *F. vasinfectum* synthétise beaucoup plus d'alanine et d'acide glutamique que les deux autres. *N. galligena* est celui qui a les plus faibles synthèses.

— *sur milieu de base + A.I.A. exogène,* il est essentiel de retenir que des doses élevées d'auxine ne modifient pas la production des acides organiques des organismes résistants, *R. nigricans* et *F. vasinfectum.* Au contraire, elles inhibent la croissance d'organismes plus sensibles, comme *N. galligena,* en provoquant aussi le blocage de la formation de certains de ces mêmes acides organiques. Enfin, il faut remarquer que le métabolisme des acides aminés et amides de *N. galligena* n'est pas perturbé par l'apport d'A.I.A. exogène. Ceci fait ressortir qu'il existe des différences marquées entre champignons résistants et non résistants à l'A.I.A. exogène. Des « métabolites antiauxines » en quantité suffisante chez les organismes résistants constitueraient peut-être le moyen de lutte de ces organismes. Au contraire, *N. galligena* n'étant pas capable par lui-même d'en synthétiser suffisamment, a besoin d'un apport extérieur le rendant alors résistant.

CHAPITRE III

ACTION DE DIFFERENTS ACIDES ORGANIQUES SUR LA LEVEE DE L'INHIBITION DE CROISSANCE PROVOQUEE PAR A.I.A. CHEZ *N. GALLIGENA*

Nous venons de voir que les acides malique, citrique, succinique, fumarique, lactique et glycolique ont leur formation bloquée chez *N. galligena* par de fortes doses d'A.I.A., et que celle-ci est rétablie au cours de la levée d'inhibition auxinique. Puisque ces acides sont liés pour la plupart aux processus respiratoires et que certains peuvent s'inscrire dans le cycle citrique, j'ai recherché en premier lieu quelle est l'action antiauxinique éventuelle des acides de ce cycle.

I. — ROLE ANTIAUXINIQUE DES ACIDES ORGANIQUES DU CYCLE CITRIQUE AU COURS DE LA LEVEE D'INHIBITION DE *N. GALLIGENA*

Dans de premiers essais, j'ai éprouvé la valeur antiauxinique des acides organiques contenus chez *F. vasinfectum* et *R. nigricans.* J'ai déjà décrit (p. 64) l'expérimentation au cours de laquelle je fournis, à l'état pur, au milieu de base contenant ou non l'A.I.A. (3.10^{-4} M/l), les acides organiques décelés chez *F. vasinfectum.* Ces acides sont utilisés seuls ou en combinaisons dans les proportions rencontrées dans le milieu de culture de *Fusarium* ou de son extrait de filaments (1). Puis *N. galligena* est ensemencé. Les résultats se sont avérés entièrement négatifs.

J'ai recherché de la même manière, quelle est sur *N. galligena,* l'action antiauxinique des acides organiques présents chez *R. nigricans.* Je les emploie soit seuls, soit mélangés dans les proportions où ils sont contenus dans les filaments et le milieu de culture de *R. nigricans.* Dans cette expérimentation encore, ces acides se sont révélés inactifs (tableau 26). Considérant que cet échec momentané était peut-être dû à des doses insuffisantes des acides en question,

(1) Je prends soin, lorsque j'évalue la teneur en acides organiques de me référer à une quantité d'extrait suffisamment importante, capable de provoquer une forte action antiauxinique (= 30 S ou 30 E).

j'ai poursuivi ces recherches en adoptant des concentrations d'acides supérieures à celles trouvées dans le milieu ou les extraits de filaments de *R. nigricans* et *F. vasinfectum*.

TABLEAU 26

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *au bout de 15 jours de culture sur milieu de base, avec ou sans A.I.A., et en présence ou non des mêmes quantités des principaux* acides organiques contenus dans le milieu *de culture de* R. nigricans, soit seuls (« *milieu* »), soit mélangés dans les proportions relatives de l'ensemble des acides organiques du milieu (*mélange milieu*) ou de l'extrait de filaments (*mélange ext. filaments*).

	A.I.A. (M/l)	
	0	3.10^{-4}
O	19	7
Milieu brut	25	25,5
Extrait de filaments	26	28
malique (« milieu »)	19	7
citrique »	20,8	6,2
succinique »	20	7,2
fumarique »	20	7,2
lactique »	19,5	6,8
glycolique »	19	7
glutarique »	19	6,9
citramalique »	20,5	7,1
glycérique »	19	7
quinique »	19,3	7,3
mélange milieu	20	7
mélange extrait filaments	21	7,2

Aussi, *dans une deuxième série d'expérimentation,* les acides citrique, isocitrique, α-cetoglutarique, succinique, fumarique et malique, sont ajoutés dans le milieu de base aux doses de 3.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l en même temps que 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. Tous les milieux, corrigés par la soude de manière à obtenir un pH de 5,5 après stérilisation, sont ensemencés avec *N. galligena*.

Dans la figure 23, sont consignées les valeurs de croissance pondérale, établies à partir de cultures âgées de 15 jours, lorsque chaque acide est utilisé seul ou en combinaison avec l'auxine.

On peut remarquer en considérant les données ci-dessus :

1° aux doses utilisées, aucun des acides organiques n'exerce une action nettement significative sur la croissance du champignon test cultivé dans le milieu de base;

2° chacun des acides fourni à l'organisme, en même temps et à la *même dose* que l'A.I.A. (3.10^{-4} M/l) est également inactif. *Par contre, sous un rapport de concentrations dix fois supérieur, ils agissent tous à des degrés divers en tant qu'antagonistes de l'action inhibitrice de l'auxine.* En effet, les acides citrique et isocitrique, α-céto-glutarique et malique, aux doses de 3.10^{-3} M/l, lèvent chacun *entièrement* l'inhibition provoquée par 3.10^{-4} M/l d'A.I.A.; les acides succinique et fumarique restituent environ 50 % de la croissance inhibée par l'A.I.A.

Ainsi, les acides malique, citrique et isocitrique, α-cétoglutarique, succinique et fumarique se comportent comme des « métabolites antiauxines ». D'autre part, la levée d'inhibition de croissance par le plus grand nombre des acides du cycle citrique indiquerait fortement qu'un tel cycle pourrait faire partie du métabolisme normal de *N. galligena.*

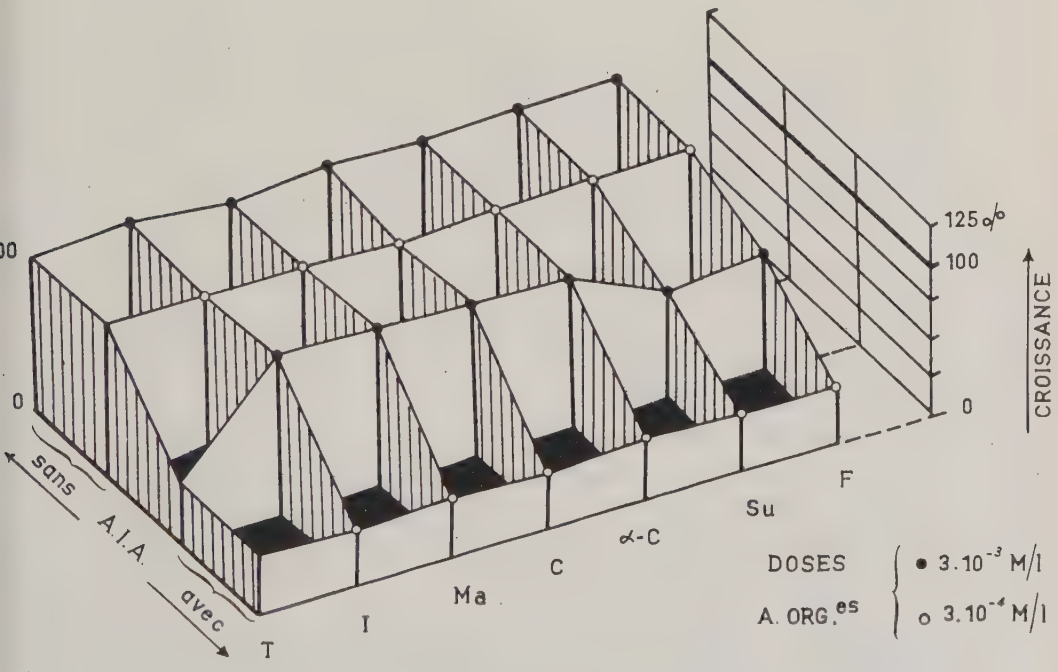


FIGURE 23

Croissance de N. galligena *(exprimée en pourcentage de celle du témoin = 100) avec ou sans A.I.A. (série T) et avec divers acides organiques dans les séries : I, isocitrique; Ma, malique; C, citrique; α-C, α-cétoglutarique; Su, succinique; F, fumarique.*

Avant de poursuivre l'enchaînement logique qui semblait découler des faits obtenus avec ces acides organiques pour situer la ou les réactions enzymatiques éventuellement bloquées par l'A.I.A., il était nécessaire d'élucider deux points : d'une part, envisager le sort de l'A.I.A. exogène au cours de la levée d'inhibition de croissance par les divers acides organiques, d'autre part préciser, le plus possible, les modalités de cette levée d'inhibition.

II. — EVOLUTION DANS LE TEMPS DE L'A.I.A. AU COURS DE LA LEVEE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *N. GALLIGENA* PAR LES ACIDES ORGANIQUES

J'ai pris pour exemples types, au cours de cette étude, les acides citrique et malique et j'ai suivi l'évolution de l'A.I.A. durant la croissance de *N. galligena* par des dosages colorimétriques et par chromatographie, selon les techniques déjà exposées.

En conséquence, *N. galligena* reçoit ou non dans le milieu de base gélosé 3.10^{-5} à 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. A ce milieu sont ajoutés $7{,}5.10^{-5}$ à $1{,}5.10^{-2}$ M/l d'acides citrique ou malique et tous les milieux sont corrigés par la soude de manière à obtenir un pH de 5,5 après stérilisation (105 °C/20 mn). Les essais se déroulent à 25 °C à l'obscurité; l'A.I.A. présent dans le milieu où s'est développé *N. galligena,* est alors analysé tout au long de l'expérience. Simultanément, une chromatographie descendante sur papier est réalisée, d'une part, à partir de l'extrait éthéré, séché à 40 °C, d'autre part, à partir du milieu gélosé ayant déjà subi l'extraction éthérée. Pour contrôle, l'évolution d'A.I.A. dans le milieu de base non ensemencé, avec ou sans gélose, est également étudiée.

Les faits expérimentaux principalement consignés dans la figure 24 et les tableaux 27 et 28, permettent de voir que :

1° *Sur milieu de base gélosé,* la synthèse d'A.I.A. par *N. galligena* reste très faible et n'est pas augmentée lorsqu'on apporte les acides malique et citrique;

2° *Sur milieux de base + A.I.A. + acides organiques :*

a) *sans gélose et non ensemencé.* Les dosages comme les chromatogrammes mettent en évidence une faible disparition de l'A.I.A. libre qui n'est pas uniquement due à l'inactivation dans le temps (en effet au bout de 15 jours, A.I.A. seul = 96,8 %; A.I.A. + acide citrique = 91,4 %).

De plus, on note la présence d'une substance nouvelle, à Rf mal défini, se présentant sous la forme d'une traînée entre le tryptophane et l'A.I.A. Il faut insister sur le fait que ce composé apparaît en l'absence de tout organisme.

b) *avec gélose, dans les fractions éthérées.*

— *dans les séries non ensemencées,* les dosages indiquent une forte disparition de l'A.I.A. libre; cette disparition est plus impor-

TABLEAU 27

Evolution en fonction du temps de la quantité d'A.I.A. (exprimée en mg/l) dans l'extrait éthéré *du milieu de base, enrichi ou non d'A.I.A. exogène et d'acide malique lorsque* N. galligena *y est ou non ensemencé.*

Jours après l'ensemencement	Acide malique (M/l)	Eau + A.I.A. (M/l)		MILIEU DE WESTERGAARD ET MITCHELL MODIFIE + A.I.A. (M/l)											
				sans gélose		avec gélose									
				non ensemencé							ensemencé				
		0	3.10^{-4}	0	3.10^{-4}	0	3.10^{-5}	6.10^{-5}	$1,5.10^{-4}$	3.10^{-4}	0	3.10^{-5}	6.10^{-5}	$1,5.10^{-4}$	3.10^{-4}
0	0	0	46,5	0	46,5	0	3	5	16,5	23,5	0	3	5	16,5	23,5
	3.10^{-4}	0	46,5	0	46,5	0	3	5	16,5	23,5	0	3	5	16,5	23,5
	$1,5.10^{-3}$	0	46,5	0	46,5	0	1,5	2,5	12	19,5	0	1,5	2,5	12	15,5
	3.10^{-3}	0	46,5	0	46,5	0	1,5	2,5	12	15,5	0	1,5	2,5	12	15,5
	6.10^{-3}	0	46,5	0	46,5	0	1	2,5	12	15,5	0	1	2,5	12	15,5
8	0	0	46	0	46	0	3	4	16,5	22	0	2,5	4	16,5	22
	3.10^{-4}	0	46	0	46	0	2,5	3	16,5	22	0	2,5	3	16,5	22
	$1,5.10^{-3}$	0	46	0	46	0	2,5	3	16,5	15,5	0	1,5	2,5	10	16,5
	3.10^{-3}	0	46	0	46	0	2,5	3	11	15,5	0	1,5	2,5	9,5	15,5
	6.10^{-3}	0	44	0	44	0	2,5	3	10	15,5	0	1	2,5	9,5	13,5
15	0	0	45	0	45	0	1,5	3	11	20,5	0	1,5	3	9,5	19,5
	3.10^{-4}	0	45	0	45	0	1,5	3	11	20,5	0	1	2,5	9,5	18,5
	$1,5.10^{-3}$	0	45	0	45	0	1	2,5	11	15,5	0	0	1	7	15,5
	3.10^{-3}	0	45	0	45	0	1	2,5	11	15,5	0	0	1	7	14,5
	6.10^{-3}	0	43,5	0	43,5	0	0	2,5	9,5	14,5	0	0	0	5	12,5

TABLEAU 28

Evolution en fonction du temps de la quantité d'A.I.A. (exprimée en mg/l) dans l'extrait éthéré du milieu de base, enrichi ou non d'A.I.A. exogène et d'acide citrique, lorsque **N. galligena** *y est ou non ensemencé.*

Jours après l'ensemencement	Acide citrique (M/l)	Eau + A.I.A. (M/l)	MILIEU DE WESTERGAARD ET MITCHELL MODIFIE + A.I.A. (M/l)													
			sans gélose		avec gélose											
			non ensemencé									ensemencé				
		0	0	3.10^{-4}	0	3.10^{-4}	0	3.10^{-5}	6.10^{-5}	$1,5.10^{-4}$	3.10^{-4}	0	3.10^{-5}	6.10^{-5}	$1,5.10^{-4}$	3.10^{-4}
0	0	0	46,5	0	46,5	0	3	5	16,5	23,5	0	3	5	16,5	23,5
		3.10^{-4}	0	46,5	0	46,5	0	1,5	2,5	5	5	0	1,5	2,5	5	5
		$1,5.10^{-3}$	0	46,5	0	46,5	0	1	2,5	5	5	0	1	2,5	5	5
		3.10^{-3}	0	46,5	0	46,5	0	1	2,5	5	5	0	1	2,5	5	5
		6.10^{-3}	0	46,5	0	46,5	0	1	2,5	5	5	0	1	2,5	5	5
8	0	0	46	0	46	0	3	4	16,5	22	0	2,5	4	16,5	22
		3.10^{-4}	0	46	0	46	0	0,5	1,5	3	4	0	1,5	2,5	4	5
		$1,5.10^{-3}$	0	46	0	46	0	0,5	1,5	3	4	0	1	2,5	3	4
		3.10^{-3}	0	46	0	46	0	0,5	1,5	3	4	0	1	2,5	3	4
		6.10^{-3}	0	43,5	0	43,5	0	0,5	1,5	2,5	4	0	1	2,5	2,5	4
15	0	0	45	0	45	0	1,5	3	11	20,5	0	1,5	3	9,5	19,5
		3.10^{-4}	0	45	0	45	0	0	1	1,5	3	0	1	1	3	5
		$1,5.10^{-3}$	0	45	0	45	0	0	1	1,5	3	0	1	1	1,5	3
		3.10^{-3}	0	45	0	45	0	0	1	1,5	3	0	1	1	1,5	3
		6.10^{-3}	0	42,5	0	42,5	0	0	1	1,5	3	0	1	1	1,5	3

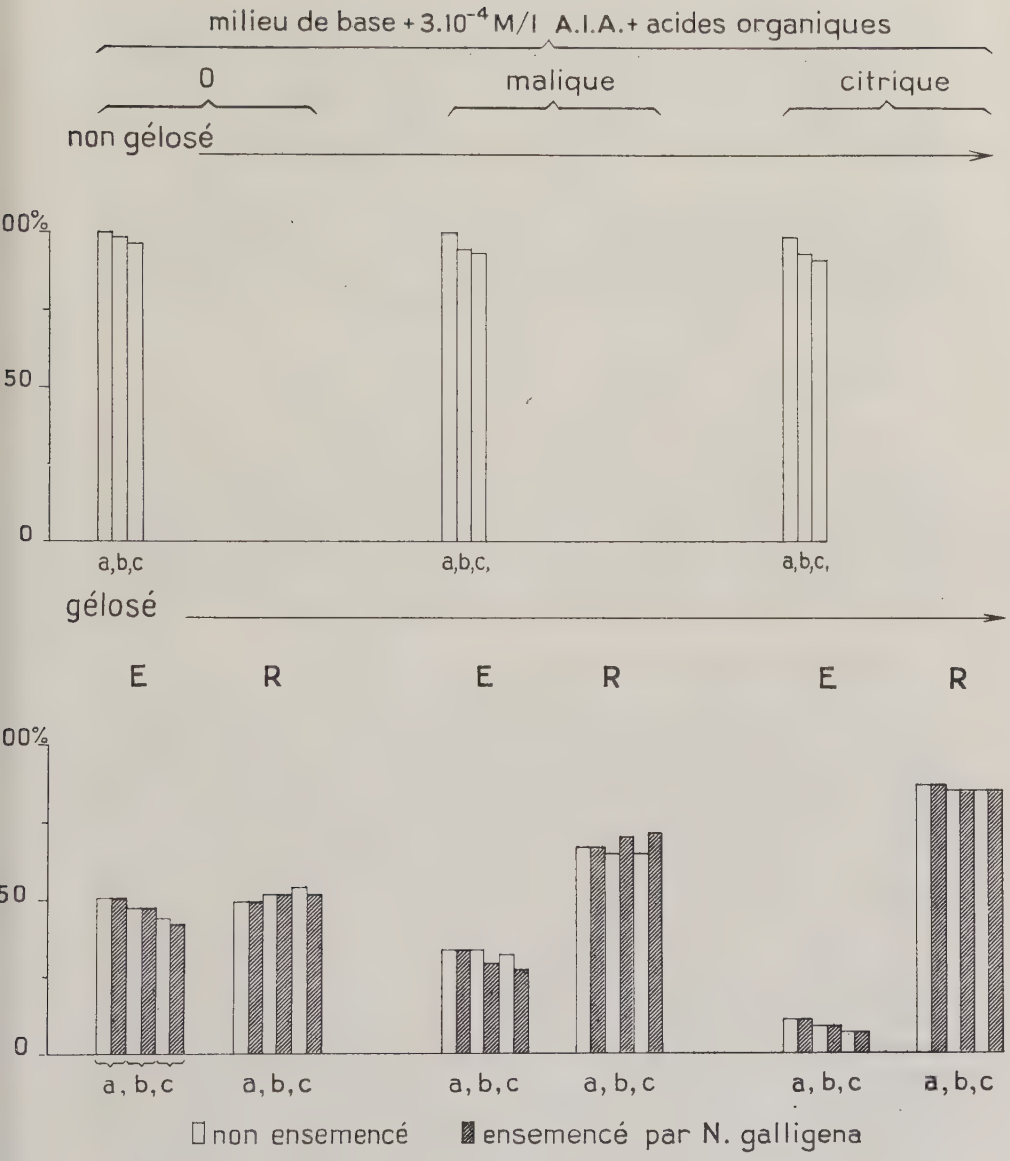


FIGURE 24

Evolution, en fonction du temps (a = o, b = 8e, c = 15e jour), de la quantité d'A.I.A. en présence ou non d'acide malique ou citrique (6.10⁻³ M/l). Milieu non gélosé : dosage colorimétrique. Milieu gélosé : E = A.I.A. dosé colorimétriquement dans l'extrait éthéré; R = A.I.A. restant dans le milieu gélosé.

tante avec l'acide citrique qu'avec l'acide malique (au bout de 15 jours : A.I.A. seul = 44 % de la quantité totale présente dans le milieu après stérilisation; A.I.A. + acide malique = 31,2 %; A.I.A. + acide citrique = 6,5 %). La chromatographie de ces fractions confirme bien une diminution considérable des taches d'A.I.A. libre sans formation d'aucun composé indolique nouveau.

— *dans les séries ensemencées,* les phénomènes constatés sont rigoureusement comparables. Mais on peut voir quelquefois une diminution plus grande encore des quantités d'A.I.A. dosées et de l'intensité des taches chromatographiées par rapport aux séries non ensemencées, notamment avec l'acide malique.

c) *dans le milieu gélosé, après extraction par l'éther, ensemencé ou non.*

L'analyse chromatographique fait remarquer au contraire que *l'A.I.A. est toujours présent de façon importante;* de plus, il y a aussi apparition de la substance déjà constatée dans les milieux non gélosés, mais en quantité bien plus grande. Ce composé est de nature indolique, insoluble dans l'éther et thermolabile. Lorsque l'acide organique introduit est de l'acide citrique, la tache indolique formée est plus ramassée qu'avec de l'acide malique.

De cet ensemble de résultats, il ressort que :

Chez *N. galligena,* les dosages effectués sur fractions éthérées laisseraient croire que l'A.I.A. a été détruit de façon importante dans le milieu gélosé additionné d'acides organiques. Toutefois, si l'on ajoute à cette quantité, l'A.I.A. restant dans la gélose après l'extraction à l'éther, l'A.I.A. total équivaut à celui qui est contenu dans les milieux exempts d'acides organiques, même dans le cas où l'on note l'existence d'un nouveau composé de nature indolique. Il faut aussi remarquer que, en l'absence de tout organisme, la présence d'acides organiques gêne la migration de l'A.I.A. dans l'éther; lorsque *N. galligena* est ensemencé, le phénomène s'accentue plus ou moins. Il est trop tôt pour se prononcer sur la signification physiologique des faits en question. Il est cependant intéressant de rapprocher dès à présent ces résultats des combinaisons que forme l'A.I.A. avec des corps de faible poids moléculaire et dont le rôle dans le métabolisme auxinique reste toutefois à préciser. On sait, par exemple, que l'A.I.A. peut s'unir à des acides aminés comme l'acide aspartique (Andreae et Good, 1955) ou le glycocolle (Zenk, 1960), au glucose (Zenk, 1961), ou encore à des polyphénols (Léopold et Plummer, 1961).

Retenons essentiellement pour le moment que chez *N. galligena,* comme dans le cas des extraits de filaments ou du milieu de culture de *R. nigricans* et *F. vasinfectum, l'A.I.A. exogène n'a pas été détruit par l'apport des acides malique et citrique, qui ne semblent pas agir non plus sur l'activation des systèmes de destruction enzymatique de l'auxine dans les cellules du champignon test.*

III. — CARACTERES DE LA LEVEE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *N. GALLIGENA* PROVOQUEE PAR L'AUXINE SOUS L'ACTION DE CERTAINS ACIDES ORGANIQUES

Nous examinerons tout d'abord le type d'antagonisme concernant les réactions A.I.A.-acides organiques chez *N. galligena*. Puis, pour essayer de préciser les réactions A.I.A.-acides organiques, nous les comparerons à un autre type d'antagonisme, arsénite de Na-acides organiques, où l'action de chacun des termes, et, en particulier, de l'inhibiteur, l'arsénite de Na, est connue dans les rôles qu'il paraît jouer par rapport aux processus respiratoires.

A. — TYPE D'ANTAGONISME CONCERNANT LES REACTIONS A.I.A.-ACIDES ORGANIQUES CHEZ *N. GALLIGENA* (1)

L'antagonisme entre des doses d'A.I.A. comprises entre 3.10^{-5} et 3.10^{-4} M/l et d'acides organiques utilisés entre 3.10^{-5} et $1{,}5.10^{-2}$ M/l a été ici étudié.

1° L'exemple *A.I.A.-acide malique* a été choisi en premier lieu. Les résultats inscrits dans le tableau 29 concernant cet antagonisme montrent que :

Pour une même valeur du rapport $\frac{\text{antiauxine}}{\text{auxine}}$ évoluant par exemple entre 10 et 100, la croissance pondérale de *N. galligena* est constante; en effet, elle est respectivement voisine de 10, 13 et 16 ± 1 mg pour des rapports de 10, 50 et 100. *L'antagonisme* considéré pourrait être ainsi de *type compétitif*. Si l'on représente maintenant la croissance du champignon en fonction du rapport $\frac{\text{antiauxine}}{\text{auxine}} = \varrho$, il semble que l'on puisse admettre en moyenne, la relation (1) :

$$y = a + b \log \varrho \qquad \text{où} \begin{cases} y = \text{croissance du champignon} \\ a \text{ et } b \text{ sont des constantes} \end{cases}$$

Ceci a été vérifié pour 3 expériences-types, où, dans chacune la croissance de chaque série témoin s'était trouvée un peu différente en valeur absolue et l'inhibition légèrement différente elle aussi. Il a pu être ainsi montré que:

1re expérience $y = 6 + 4{,}6 \log \varrho$
2e expérience $y = 10{,}7 + 3 \log \varrho$
3e expérience $y = 9{,}5 + 4 \log \varrho$

La figure 25 représente ces données.

(1) Les calculs mathématiques concernant cette relation ont été effectués au laboratoire de Statistique de la Faculté des Sciences de Toulouse, grâce à la très grande obligeance de M. le Professeur Huron.

TABLEAU 29

Croissance de N. galligena *(poids sec en mg) dans le cas d'un antagonisme A.I.A. - acide malique de type compétitif. — Les chiffres entre parenthèses indiquent le rapport des concentrations pour les substances antagonistes.*

A.I.A. (M/l)	ACIDE MALIQUE (M/l)										
	0	$7{,}5.10^{-5}$	$1{,}5.10^{-4}$	3.10^{-4}	$7{,}5.10^{-4}$	$1{,}5.10^{-3}$	3.10^{-3}	$3{,}75.10^{-3}$	6.10^{-3}	$7{,}5.10^{-3}$	$1{,}5.10^{-2}$
0	17	17,1	17	16,9	17,2	17	17,1	17,2	17	17,5	17,8
3.10^{-5}	9,6			9,6 (10)		13,2 (50)			16		
6.10^{-5}	6,8			6,8		12,5	11,5 (50)		16,5 (100)		
$7{,}5.10^{-5}$	6,7	6,8 (1)			10,3 (10)		12,9 (50)		16 (100)		
$1{,}5.10^{-4}$	6		6,2 (1)	6,4		13 (10)	13		14,9	14,1 (50)	17,1 (100)
3.10^{-4}	5			5,5 (1)		9	10,9 (10)		14		13,7 (50)

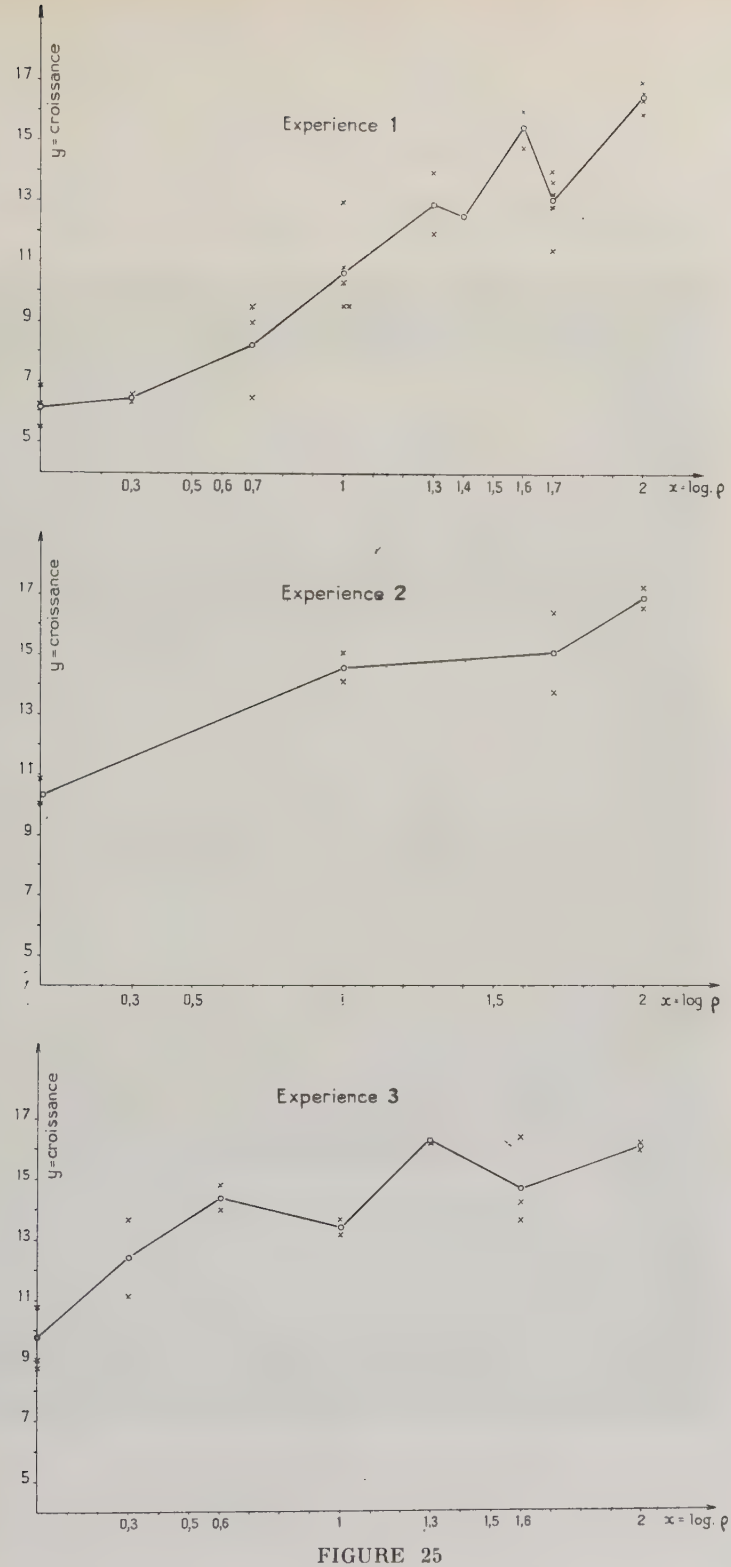


FIGURE 25

Croissance de **N. galligena** *en fonction du logarithme du rapport* $\frac{a.\ malique}{A.I.A.} = \rho$. *Age des cultures :* 15 *jours.*

TABLEAU 30

Croissance de N. galligena *(poids sec en mg) dans le cas d'antagonisme A.I.A. - acide malique où l'effet compétitif ne peut être admis (pour comparaison cf. tableau* 29*). (Age des cultures :* 15 *jours).*

A.I.A. (M/l)	ACIDE MALIQUE (M/l)				
	0	3.10^{-4}	$1{,}2.10^{-3}$	3.10^{-3}	6.10^{-3}
0	20	21,7	23	19,2	19
3.10^{-5}	14	25 *(10)*	19,5 *(40)*	22 *(100)*	23,5 *(200)*
6.10^{-5}	12,5	19 *(5)*	17,1 *(20)*	13,5 *(50)*	18,3 *(100)*
$1{,}5.10^{-4}$	6	6 *(2)*	8 *(8)*	7 *(20)*	11 *(40)*
3.10^{-4}	4	10,5 *(1)*	20,4 *(4)*	9 *(10)*	9 *(20)*

Il faut cependant formuler certaines réserves, car malgré la répétition du phénomène, quelques exceptions sont aussi à considérer. Pour illustrer cette remarque, je donne dans le tableau 30, un cas d'expériences où, tout en ayant levée d'inhibition par l'acide malique, le terme compétitif ne peut être admis; la fréquence de ces irrégularités est, dans le contexte de mon travail, de deux fois pour neuf.

Enfin, quelques autres particularités de cette levée d'inhibition sont encore à retenir. Les figures 26 A et B font ressortir qu'en présence d'une dose donnée d'auxine, la croissance pondérale de *N. galligena* est une fonction, en général non décroissante, de la concentration en acide malique. Cette courbe présente le plus souvent des paliers pour certaines concentrations d'acide malique.

2° *Antagonisme d'A.I.A. avec les autres acides organiques.*

Les faits précédemment décrits pourraient faire penser à un engagement assez direct entre l'acide malique et l'auxine. Or la difficulté va surgir dès l'instant où n'importe lequel des acides organiques, dont il a déjà été question, pourrait jouer un rôle identique.

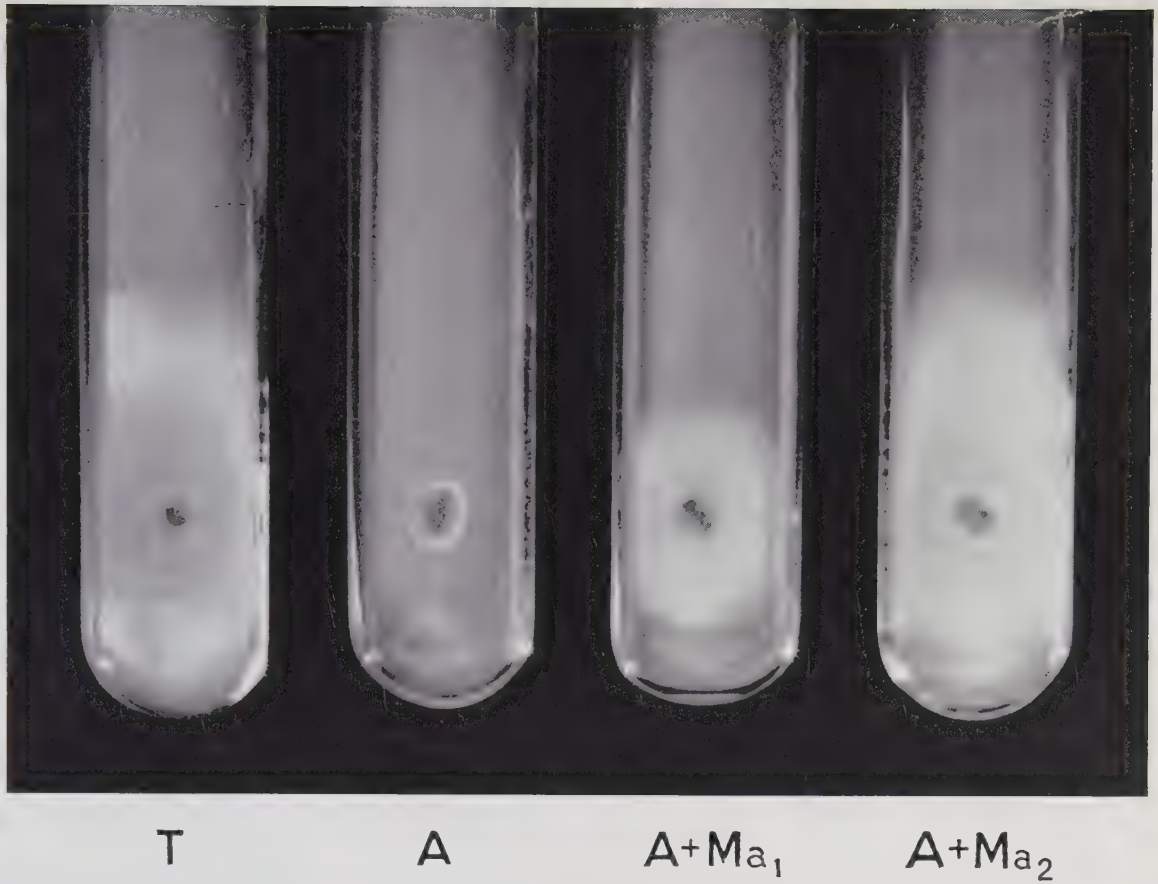


FIGURE 26 B

Antagonisme A.I.A. - acide malique sur la croissance de N. galligena. *Cultures âgées de* 15 *jours sur : T = milieu de base; A = T + A.I.A.* (3.10^{-4} *M/l*); *A + Ma*$_1$ *= T + A.I.A. +* $1{,}5.10^{-3}$ *M/l d'acide malique; A + Ma*$_2$ *= T + A.I.A. +* 6.10^{-3} *M/l d'acide malique.*

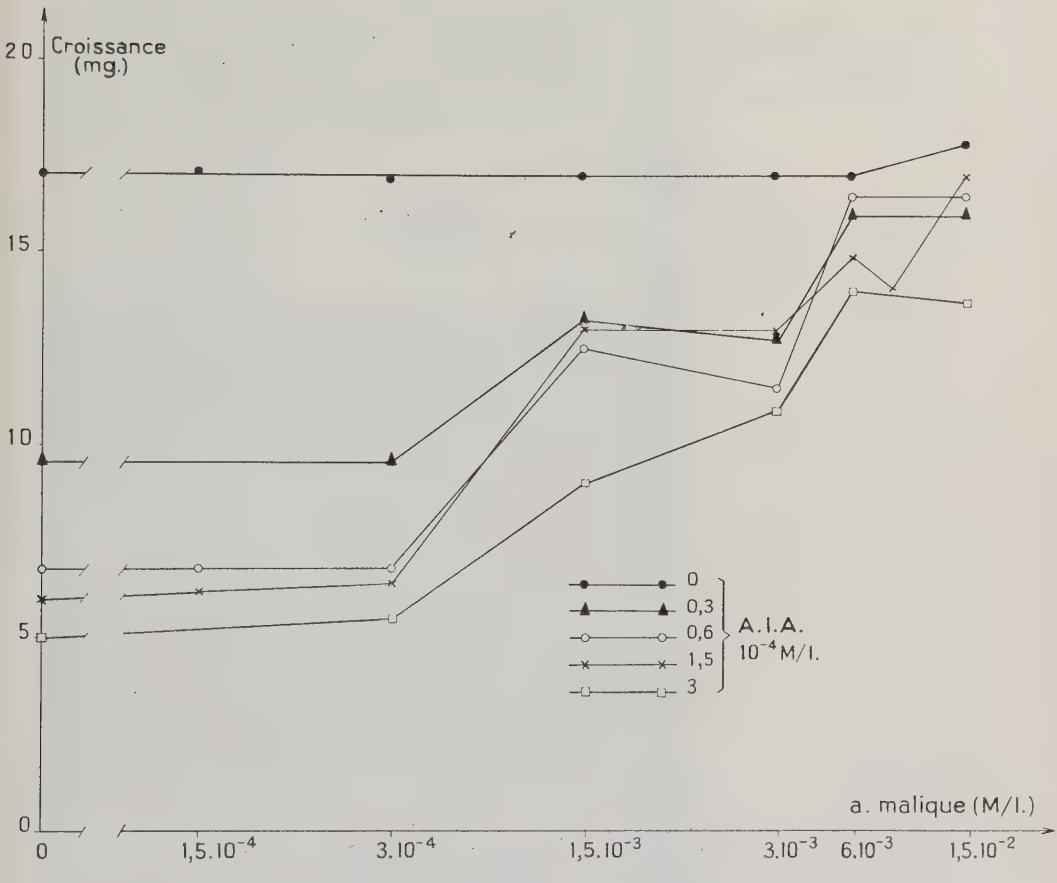


FIGURE 26 A

Croissance pondérale, au bout de 15 *jours, de* N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant des doses croissantes d'acide malique en présence ou non d'A.I.A.*

On peut noter (tableau 31) que l'*acide citrique*, que j'ai pu éprouver à de nombreuses concentrations, présente avec A.I.A. un antagonisme le plus souvent compétitif. Pour une même valeur du rapport $\frac{\text{antiauxine}}{\text{auxine}}$ de 10 ou 100, la croissance est de 10 et 18 ± 1 mg; de plus, pour une dose donnée d'A.I.A., la croissance pondérale de *N. galligena* est là aussi une fonction du type précédemment décrit, en général non décroissante, de la concentration en acide citrique (figures 27 A et B).

TABLEAU 31

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *recevant de l'A.I.A. et de l'acide citrique sous différents rapports de concentrations. (Age des cultures : 15 jours.)*

A.I.A. (M/l)	ACIDE CITRIQUE (M/l)				
	0	3.10^{-4}	$1{,}5.10^{-3}$	3.10^{-3}	$6{,}10^{-3}$
0	17	17,1	17,3	16,8	17,2
3.10^{-5}	9,6	9,8 *(10)*	9,8 *(50)*	19,5 *(100)*	18 *(200)*
6.10^{-5}	6,5	9,7 *(5)*	10 *(25)*	16 *(50)*	17 *(100)*
$1{,}5.10^{-4}$	6	10 *(2)*	10 *(10)*	10 *(20)*	16,5 *(40)*
3.10^{-4}	5	8 *(1)*	9 *(5)*	9 *(10)*	15 *(20)*

L'acide isocitrique produit les mêmes effets que l'acide citrique, tout au moins aux doses employées. *L'acide α-cétoglutarique* semble lui aussi avoir une activité comparable à celle des acides citrique et malique. Enfin, *les acides fumarique et succinique*, bien qu'un peu moins actifs, ont cependant toujours le même type d'action sur la croissance pondérale de l'organisme test pour une dose donnée d'A.I.A. (figure 28).

L'ensemble des résultats exposés montre qu'*il existe chez* N. galligena *une relation directe, et en partie chiffrable, entre le besoin en acides organiques du cycle citrique de Krebs et la quantité d'A.I.A. déterminant une inhibition de croissance. Cette relation revêt pour la plupart des cas un antagonisme de type compétitif.*

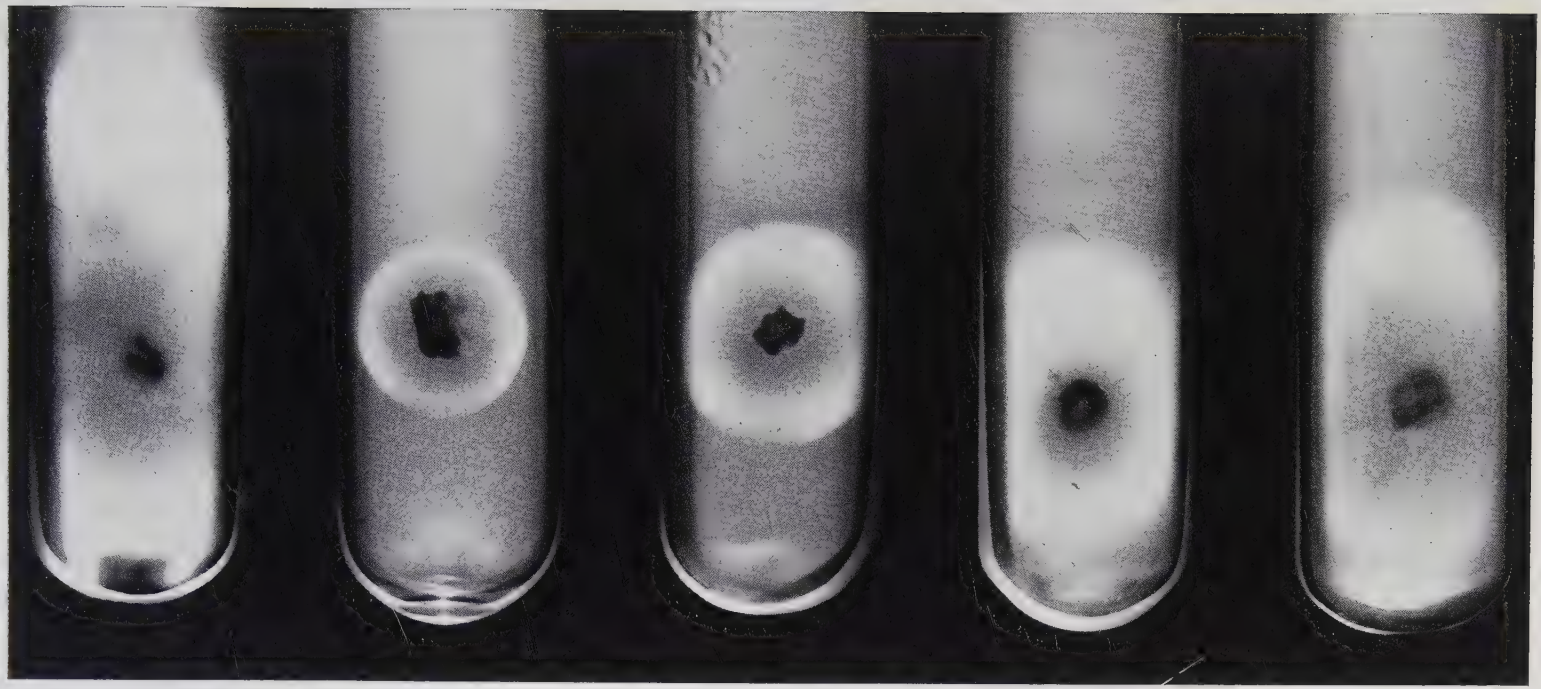


FIGURE 27 B

Croissance de N. galligena *dans le cas de l'antagonisme A.I.A. - acide citrique. Cultures âgées de* 15 *jours sur : T = milieu de base; A = T + A.I.A.* (3.10^{-4} *M/l*); *A + acide citrique* (*C*), *aux concentrations de* (1) = 3.10^{-4}, (2) = $1,5.10^{-3}$, (3) = 6.10^{-3} *M/l.*

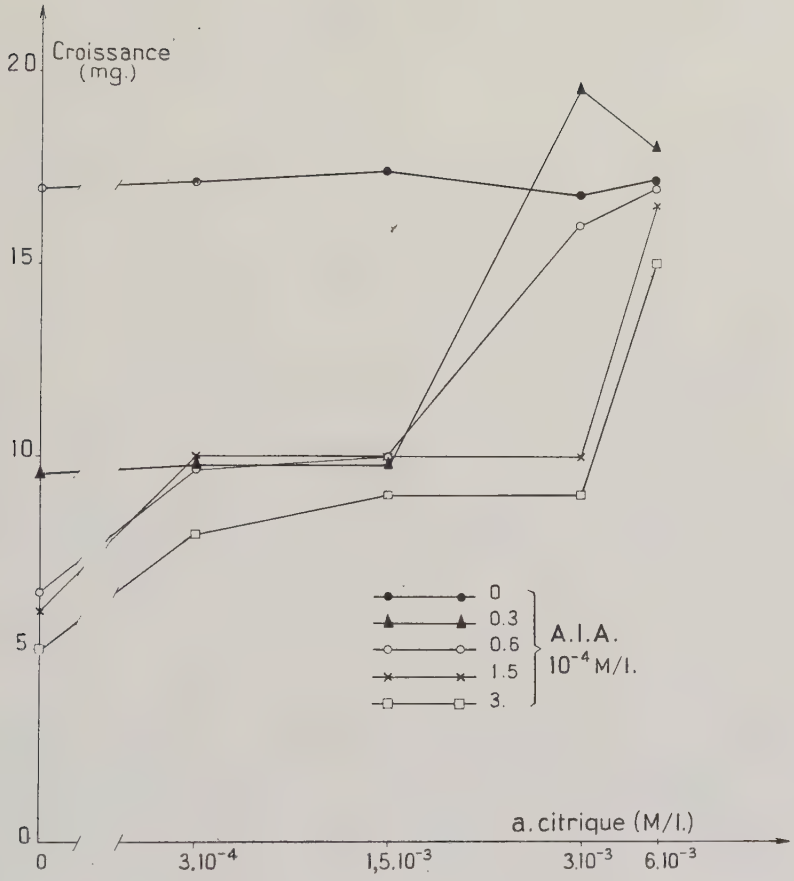


FIGURE 27 A

Croissance pondérale, au bout de 15 *jours, de* N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant des doses croissantes d'acide citrique en présence ou non d'A.I.A.*

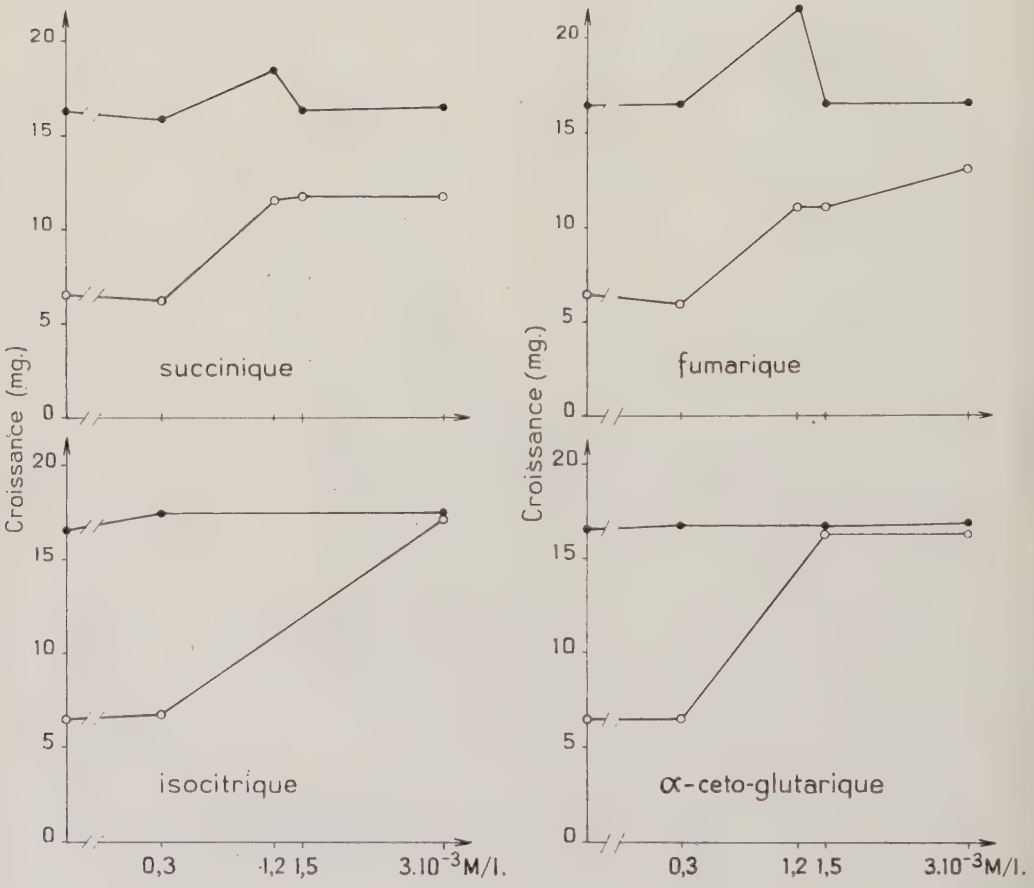


FIGURE 28

Action de différents acides du cycle citrique sur la croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base seul* (—●—●—) *ou additionné de* 3.10^{-4} *M/l d'A.I.A.* (–O–O–)

B. — ACTION ANTIAUXINIQUE DE CERTAINS ACIDES ORGANIQUES DES PROCESSUS RESPIRATOIRES DISTINCTS DU CYCLE CITRIQUE

Lorsque le champignon test pousse dans un milieu contenant l'A.I.A., on pouvait penser que puisqu'il y a blocage d'une synthèse à un niveau déterminé d'une voie métabolique où paraît en cause le cycle citrique, il aurait pu y avoir accumulation de substances. Or, les différentes investigations poursuivies ont mis en évidence dans les expériences qui viennent d'être décrites que chez *N. galligena :*

Pour les acides organiques, en ce qui concerne ceux situés juste avant leur entrée dans le cycle comme l'acide pyruvique ou acétique par exemple, *on ne trouve aucune trace* de ces acides dans les filaments ou les milieux de culture de l'organisme test. Pour ceux faisant partie du cycle, aucune accumulation n'a jamais été mise en évidence pour aucun d'eux ni pour certains corps qui pourraient leur être liés par un équilibre chimique donné comme acide α-cétoglutarique ⇄ acide glutamique, acide oxaloacétique ⇄ acide aspartique, par exemple. Ces faits prouvent que, d'une part, s'il y a blocage de la formation de certains acides organiques, d'autre part, il n'y a pas accumulation des corps qui dérivent directement de ces acides.

Enfin, pour aucun des *acides aminés et amides* trouvés dans le milieu de culture de *N. galligena* ou dans l'extrait de ses filaments, je n'ai pu déceler, comme je l'ai déjà mentionné, de variations suffisantes montrant l'accumulation d'une substance aminée donnée. Il fallait penser que la ou les réactions bloquées dont la *manifestation* se situe, en ce qui nous concerne, au niveau des acides organiques, se trouvent en dehors du cycle citrique de Krebs, le blocage de ce cycle n'en étant que l'expression concrète.

Il paraissait donc utile d'envisager le rôle possible d'acides organiques situés en dehors du cycle, mais quand même en relation étroite avec lui. A cet effet, j'ai éprouvé l'activité antiauxinique des acides banaux rencontrés préalablement dans les extraits ou milieux de *N. galligena* comme les acides lactique, glycolique et de deux autres se situant juste avant l'entrée du cycle citrique comme les acides acétique et pyruvique. Ces acides, aux doses de 3.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l, ont été introduits avec ou sans A.I.A. (3.10^{-4} M/l) dans le milieu de base habituel.

Cette expérimentation a donné les résultats suivants :

1° Tous les acides fournis à la dose de 3.10^{-4} M/l sont inactifs sur l'inhibition auxinique provoquée par une dose équivalente d'A.I.A. L'action antiauxinique commence lorsque le rapport acide organique/A.I.A. atteint une valeur voisine de 5; pour un rapport de concentrations égal à 10, la levée d'inhibition est le plus souvent totale dans le cas des acides pyruvique, lactique et glycolique et seulement partielle s'il s'agit de l'acide acétique. Ces faits sont donc très comparables à ceux déjà recueillis avec les acides du cycle citrique.

2° En présence de 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., la croissance pondérale de *N. galligena* est en général une fonction non décroissante de la concentration en chacun des acides organiques précités.

Les figures 29 A et B et le tableau 32 contiennent ces résultats.

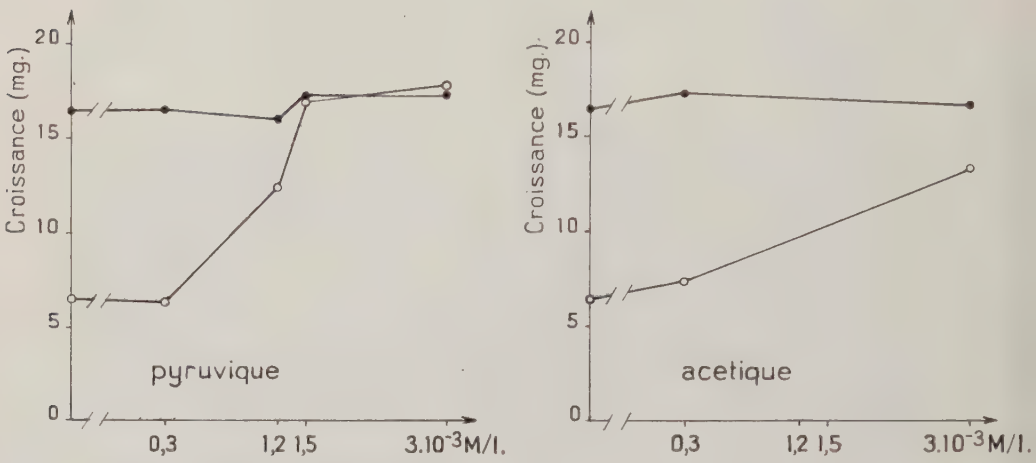


FIGURE 29 A

Action de quelques acides organiques sur la croissance pondérale de N. galligena *cultivé sur milieu de base seul* (—●—●—) *ou additionné de* 3.10^{-4} *M/l d'A.I.A.* (—○—○—).

Ces faits, fort intéressants, nous amenaient à penser que l'A.I.A., en bloquant une des voies menant au cycle citrique, intervenait peut-être aussi à d'autres niveaux en détournant dans d'autres directions les produits qui auraient pu s'accumuler. Il était alors intéressant de comparer chez *N. galligena* l'action inhibitrice de l'A.I.A. à celle d'un autre inhibiteur de croissance, l'arsénite de Na, qui interviendrait chez d'autres tests essentiellement dans l'utilisation de l'acide pyruvique. Ceci permettrait d'apprécier si les corps reconnus comme anti-inhibiteurs vis-à-vis de l'A.I.A. l'étaient aussi vis-à-vis de l'arsénite. Il devenait sans doute possible de déceler alors, si le blocage dû à l'A.I.A. intéressait la même réaction que celle de l'arsénite ou d'autres à la fois.

C. — ACTION COMPAREE DE L'ARSENITE DE SODIUM ET DE L'A.I.A. SUR LA CROISSANCE DE *N. GALLIGENA*

L'emploi des inhibiteurs respiratoires pour l'étude de la croissance notamment par Bonner (1948), Bonner et Thimann (1950), Thimann (1949), a montré que si le fluorure de Na manque de spécificité, l'iodoacétate agissant au niveau du cycle citrique produit une accumulation d'acides organiques; l'arsénite de Na qui inter-

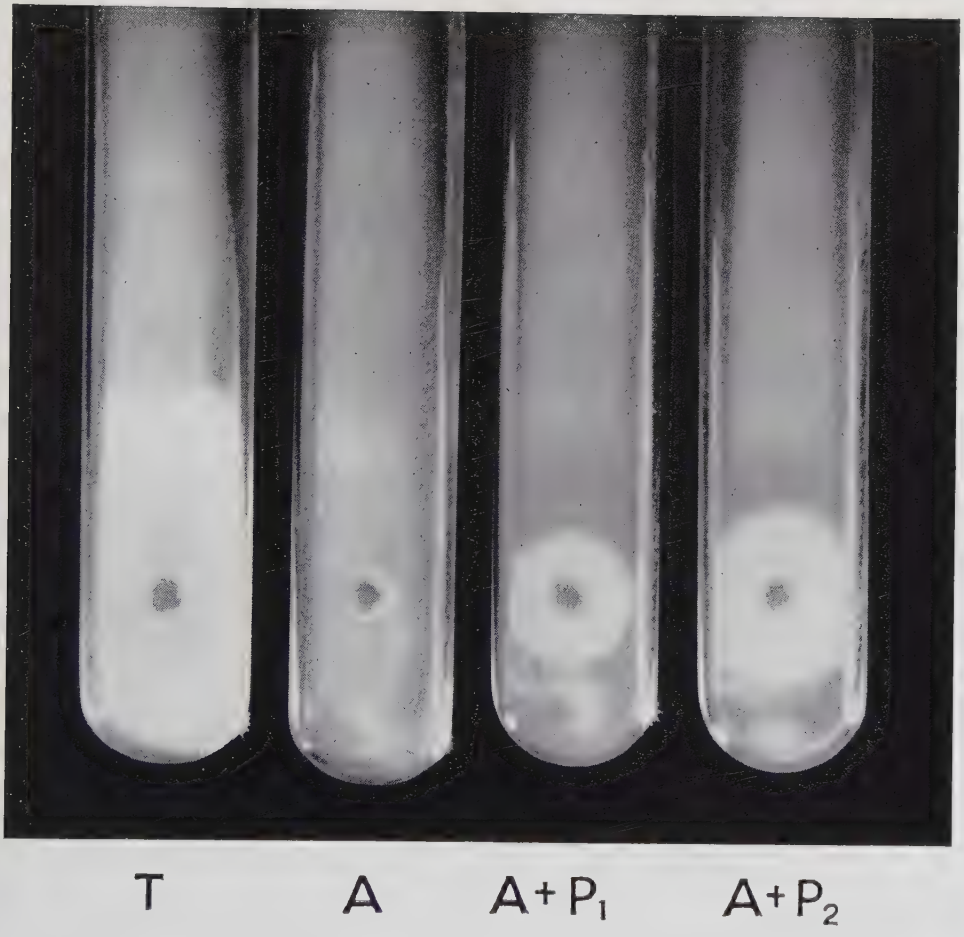


FIGURE 29 B

Croissance de N. galligena *dans le cas de l'antagonisme pyruvate de sodium - A.I.A. sur : T = milieu de base; A = T + A.I.A.* (3.10^{-4} *M/l*); *A + P_1 = A + pyruvate de sodium* (1.10^{-3} *M/l*); *A + P_2 = A + pyruvate de sodium* (3.10^{-3} *M/l*). *Age des cultures :* 15 *jours.*

TABLEAU 32

Croissance pondérale en mg au bout de 15 *jours de* N. galligena *recevant ou non de l'A.I.A. et différents acides organiques (distincts du cycle citrique).*

	A.I.A. M/l									
	0					3.10^{-4}				
	0	3.10^{-4}	$1,2.10^{-3}$	$1,5.10^{-3}$	3.10^{-3}	0	3.10^{-4}	$1,2.10^{-3}$	$1,5.10^{-3}$	3.10^{-3}
Concentrations en M/l d'acides										
pyruvique	16,5	16,5	16	17,3	17,3	6,9	6,3	12,4	17,3	17,5
acétique	16,5	17,3		16,8	16,5	6,5	7,4		12	13,2
lactique	16,5	15			16	6,5	6,2			16,1
glycolique	16,5	16,5		16,9	17	6,5	6,4		13	17,2

viendrait dans l'utilisation de l'acide pyruvique détournerait le métabolisme des sucres vers la synthèse de corps gras et ne produirait pas une accumulation d'acides organiques.

— Aussi, en premier lieu, j'ai choisi comme inhibiteurs de la croissance de *N. galligena*, l'arsénite de Na et l'A.I.A., et comme anti-inhibiteurs la biotine et quelques acides organiques, tels que les acides malique et citrique.

Dans ce but, *N. galligena* est cultivé, pour certaines séries, sur le milieu de base habituellement employé renfermant ou non soit 3.10^{-5} à 3.10^{-4} M/l d'A.I.A., soit 1.10^{-5} à 3.10^{-4} M/l d'arsénite de sodium. Dans d'autres séries, les acides malique et citrique utilisés de 3.10^{-5} à $1{,}5.10^{-2}$ M/l ou encore 0,1 mg/l de biotine sont incorporés au milieu de base contenant ou non l'arsénite ou l'A.I.A. Les principaux résultats sont exposés dans les figures 30 et 31 et le tableau 33.

Nous constatons que l'arsénite de sodium exerce une action inhibitrice sur la croissance de *N. galligena*. Alors qu'elle atteint 17 mg dans les séries témoins, la croissance est de 12,4 mg dans celles renfermant 3.10^{-4} M/l d'arsénite. Si l'on fournit en même temps que l'arsénite, soit 3.10^{-3} M/l d'acides malique ou citrique, soit 0,1 mg/l de biotine, le poids des cultures retrouve des valeurs au moins égales à celles des témoins (18 mg $\pm$ 1 dans le cas de l'acide malique et 16 mg $\pm$ 2 dans le cas de l'acide citrique). La biotine se trouve même alors accélératrice de la croissance du champignon test (le poids sec du témoin étant de 17 mg, ceux des séries à biotine oscillent entre 30 et 33 mg). Il faut remarquer aussi qu'une dose donnée d'acides malique ou citrique lève de la même manière l'inhibition de croissance provoquée par 1.10^{-5} à 3.10^{-4} M/l d'arsénite; ces mêmes observations peuvent être faites pour les cultures recevant de la biotine et de l'arsénite; quelle que soit la valeur du rapport $\frac{\text{métabolite}}{\text{antimétabolite}}$ la valeur de la croissance reste donc à peu près constante, tout au moins aux doses utilisées. *Les acides malique ou citrique ou bien la biotine renversent donc chacun entièrement, et sans compétition, l'inhibition de croissance due à l'arsénite.*

Si l'on compare maintenant le mode d'action des deux inhibiteurs, il faut souligner, d'une part, qu'*à concentrations égales avec l'arsénite, l'A.I.A. provoque toujours une inhibition beaucoup plus importante*, supérieure de 35 % par rapport à la croissance du témoin (ex. : croissance du témoin : 17 mg; avec 3.10^{-4} M/l d'arsénite : 12,4 mg; avec 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. : 6,5 mg). D'autre part, la biotine joue avec chacun des deux inhibiteurs un rôle comparable en rétablissant complètement et sans compétition une croissance normale de l'organisme. Enfin, et surtout, l'antagonisme arsénite-acides malique ou citrique, de *type non compétitif*, est différent de l'antagonisme *A.I.A.-acides organiques*, de type compétitif.

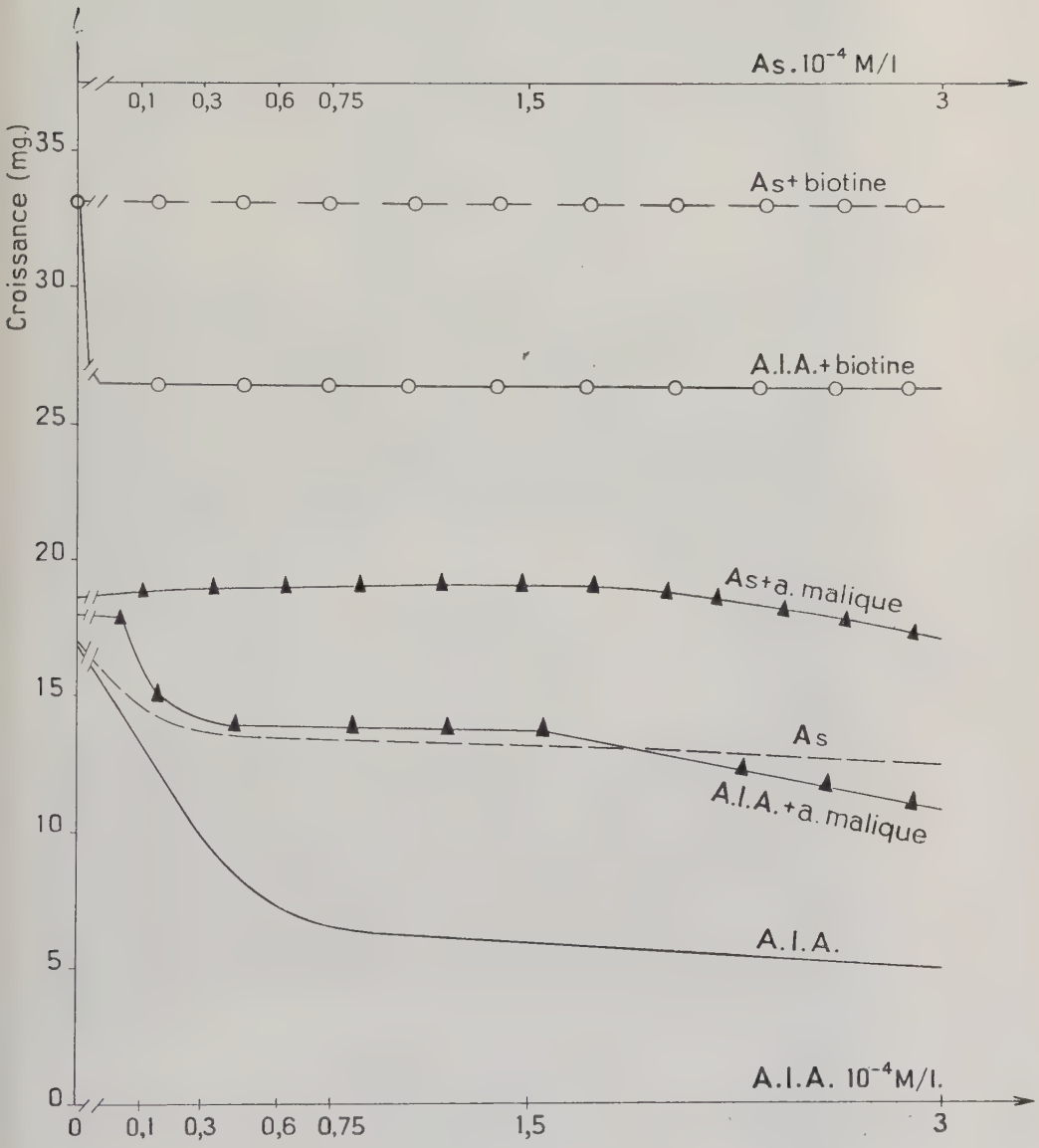


FIGURE 30

Croissance pondérale au bout de 15 *jours de* N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant soit l'A.I.A., soit l'arsénite de Na (As) en présence ou non d'acide malique* (3.10^{-4} *M/l) ou de biotine* (0,1 *mg/l).*

TABLEAU 33

Croissance pondérale (poids sec en mg), au bout de 15 jours, de N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant soit l'A.I.A., soit l'arsénite de Na (As) en présence ou non de biotine, d'acide malique ou d'acide citrique.*

Inhibiteurs de croissance (M/l)		« Métabolites antiauxines »									
		0	Biotine (0,1 mg/l)	Acide malique (M/l)				Acide citrique (M/l)			
				1.10^{-4}	3.10^{-4}	1.10^{-3}	3.10^{-3}	1.10^{-4}	3.10^{-4}	1.10^{-3}	3.10^{-3}
	0	17	35,3	18,5	19	20	18,5	18	18,5	18	23,3
As	1.10^{-6}	13,2	30,1	19,9	21	20,2	18,2	16	16,2	16,5	
As	3.10^{-5}	13,5	33,6		18,6		19,5		16,3		16,3
As	1.10^{-4}	13	30	17,1	20,2	20,5	18,9	16	16,2	17,6	18,2
As	3.10^{-4}	12,4	33,1		19,9	15,9	17,1		13,5		14,7
A.I.A.	3.10^{-4}	6,5	26,3	6,4	6,7	12,5	12,2	6,9	7,1	11,3	12,4

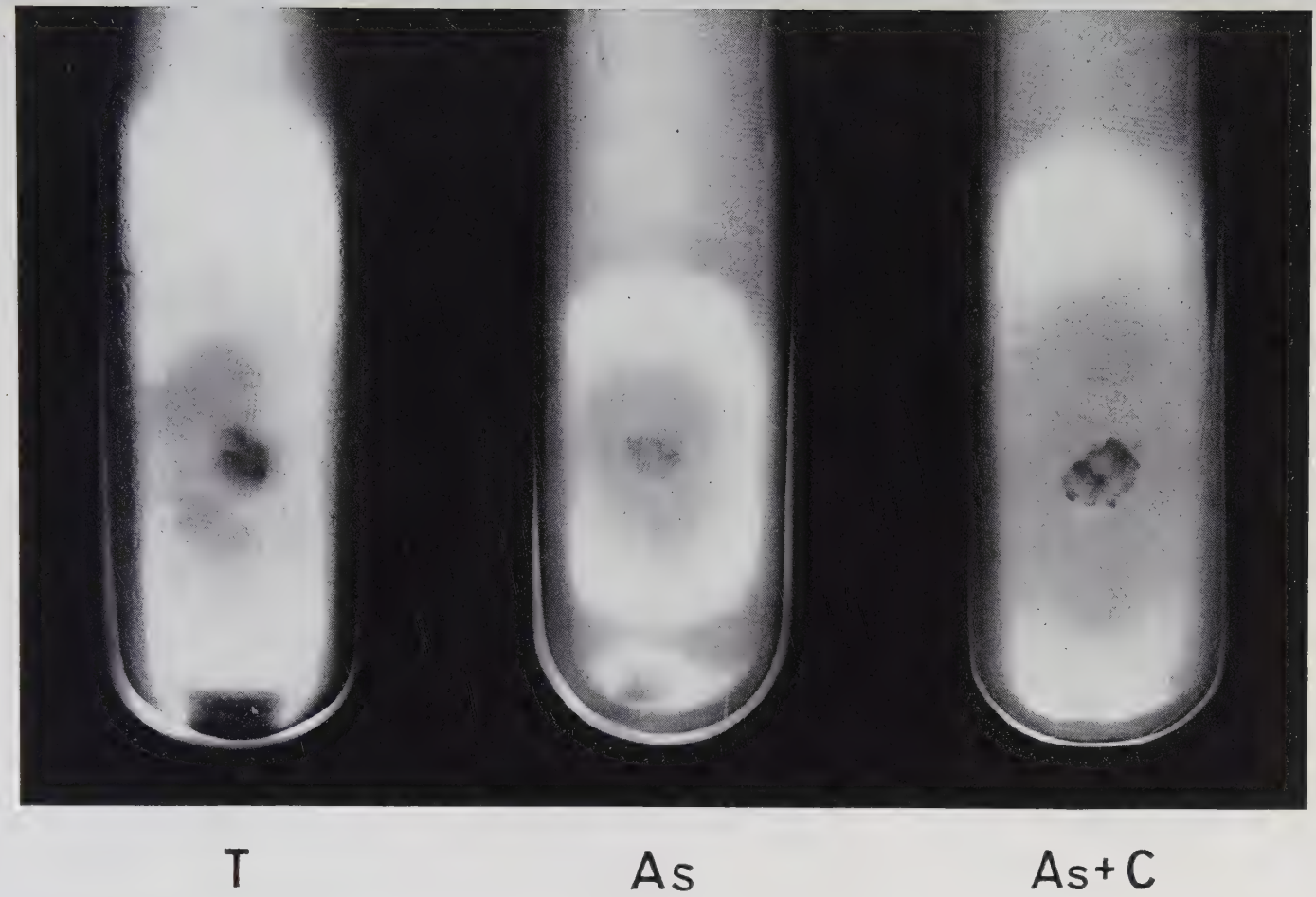


FIGURE 31

Croissance de N. galligena *dans le cas de l'antagonisme acide citrique-arsénite de sodium. Sur milieu de base T; T + arsénite* (3.10^{-4} *M/l*) = *As; T + arsénite + acide citrique* (3.10^{-3} *M/l*) = *As + C. Age des cultures :* 15 *jours.*

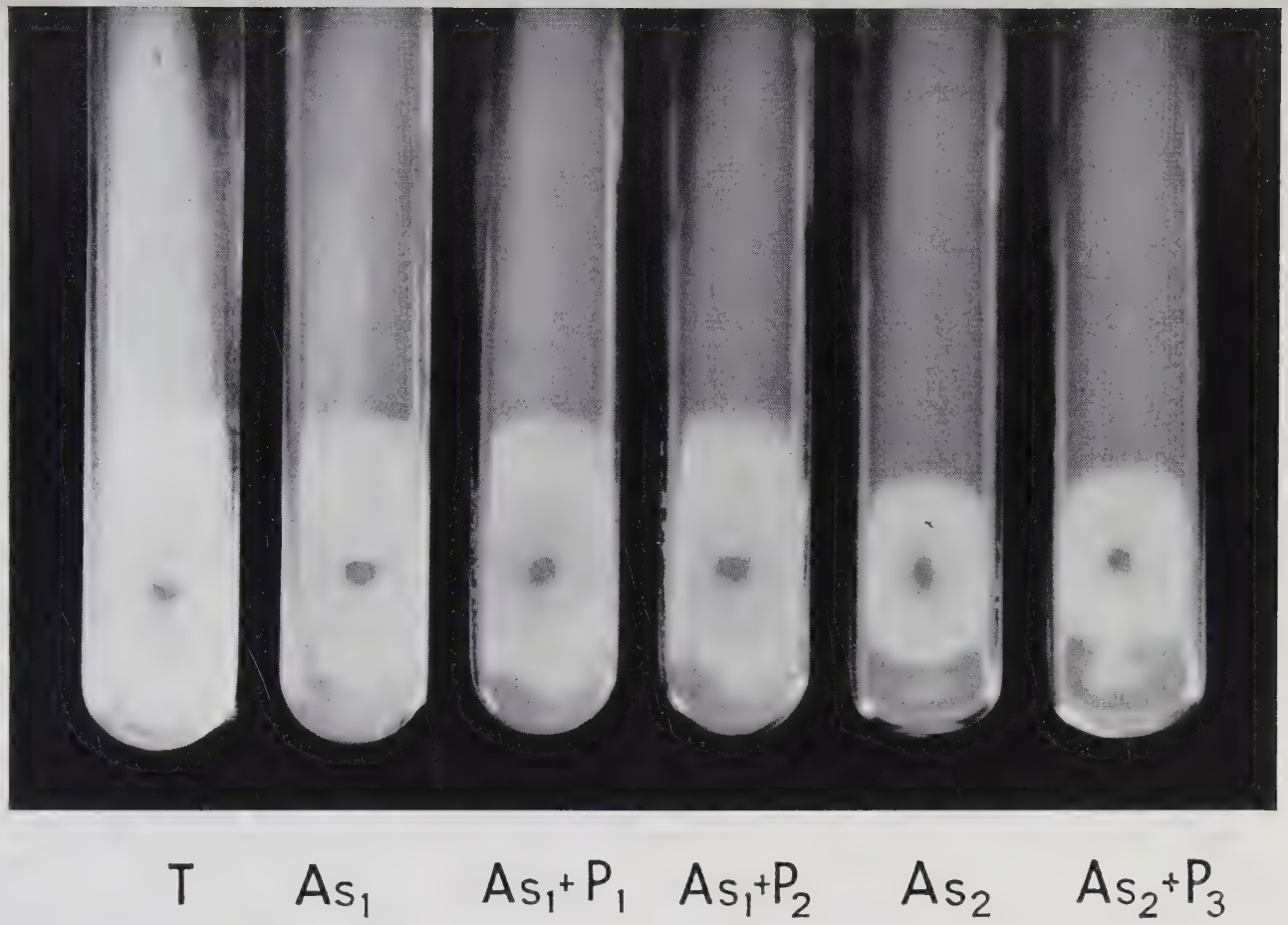


FIGURE 32

Croissance de N. galligena dans le cas de l'antagonisme pyruvate de sodium-arsénite de sodium sur T = milieu de base;

— Les acides malique ou citrique lèvent l'inhibition due à l'arsénite. Il venait alors logiquement à l'esprit que l'acide pyruvique dont on sait que la décarboxylation oxydative est bloquée par l'arsénite, ne devait pas lever l'inhibition due à l'arsénite. Pour éprouver cette idée, j'ai cultivé *N. galligena* dans les mêmes conditions que précédemment (p. 130) mais en fournissant comme antagoniste de l'arsénite, l'acide pyruvique cette fois, aux concentrations de 1.10^{-4} à 3.10^{-3} M/l.

J'ai pu constater (tableau 34 et figure 32) que l'acide pyruvique ne lève pas, dans les limites de notre expérimentation, l'inhibition de croissance de *N. galligena* due à l'arsénite. En effet, même une faible inhibition (14 % de la croissance du témoin)

TABLEAU 34

Croissance pondérale (poids sec en mg) de N. galligena *cultivé sur milieu de base contenant soit l'A.I.A., soit l'arsénite de sodium (As) en présence ou non de pyruvate de sodium. (Age des cultures : 15 jours.)*

Inhibiteurs de croissance (M/l)		Pyruvate de sodium M/l					
		0	1.10^{-4}	3.10^{-4}	1.10^{-3}	3.10^{-3}	1.10^{-2}
	0	17,8	17,5	17,9	16,9	19	19,1
As	1.10^{-5}	16	17,1	15,3	16		
	3.10^{-5}	16,4		16,2		15,6	
	1.10^{-4}	15,4	15,8	15,5	15,5	15,1	15,1
	3.10^{-4}	14,9		15,9	14,2	14,2	
	1.10^{-3}	9,1			9,6	9,1	9,6
A.I.A.	3.10^{-4}	7,4	7,6	8,3	8,9	10,2	17,2

provoquée par 10^{-4} M/l d'arsénite, ne peut être levée par une dose cent fois supérieure (10^{-2} M/l) de pyruvate. Au contraire, la même dose de pyruvate lève entièrement la forte inhibition (60 % de la croissance du témoin) causée par 3.10^{-4} M/l d'A.I.A. Ces faits, bien qu'incomplets, méritaient d'être signalés. En effet, si l'on veut localiser de façon précise l'inhibition due à l'A.I.A. en la comparant à celle d'un inhibiteur mieux connu, il s'avère alors utile de remarquer que, de toutes manières, les deux inhibitions, si elles présentent quelques points communs, sont en tous cas différentes.

De plus, il faudrait aussi envisager que l'acide pyruvique dont on ne trouve pas d'accumulation dans le cas de l'inhibition due à

l'A.I.A., peut emprunter une ou des voies de remplacement. Dans l'état actuel de cette recherche, il n'est pas possible, sinon on s'écarterait des faits expérimentaux, de pousser plus loin les conclusions.

*
**

L'ensemble de l'expérimentation qui vient d'être exposée dans cette deuxième partie du travail fait apparaître plusieurs points essentiels :

— Les substances antiauxiniques synthétisées par les champignons résistants à l'A.I.A. exogène et contenues dans les extraits de filaments ou leurs milieux de culture, ou encore extraites et isolées de ces milieux, comme la biotine, le corps X, le facteur *Fusarium I*, ne rendent pas *N. galligena* capable de dégrader ou de détruire l'A.I.A. exogène.

— Au cours de l'inhibition de croissance provoquée par l'A.I.A. exogène, *N. galligena* a son métabolisme profondément modifié dans la synthèse de certains acides organiques. En particulier, quelques acides du cycle citrique ne paraissent plus se former. Le métabolisme des acides aminés ne semble pas subir de variation notable. On ne décèle pas d'accumulation de substances de type acides organiques ou acides aminés ou amides.

Le métabolisme de l'organisme sensible est confronté au métabolisme des organismes résistants comme *R. nigricans* et *F. vasinfectum*. Il est montré que ces derniers champignons, recevant dans leur milieu de base de l'A.I.A. en excès, ne subissent aucune perturbation métabolique en ce qui concerne les acides organiques et aminés et les amides.

— L'adjonction au milieu de base contenant l'A.I.A., de « métabolites antiauxines » sécrétés par les organismes résistants, rétablit les synthèses bloquées par cette auxine chez *N. galligena*.

— Les acides organiques dont la formation est bloquée par un apport trop important d'A.I.A. exogène, se comportent à leur tour comme des « métabolites antiauxines ». L'antagonisme se précise puisqu'il se présente ici sous forme compétitive dans la plupart des cas.

— On remarquera dans l'étude de la croissance et de son inhibition chez le test *N. galligena*, le rôle particulier de la biotine qui, d'une part, lève l'inhibition, d'autre part, stimule les synthèses des acides organiques en question.

— L'arsénite de Na inhibe la croissance de *N. galligena* mais de façon plus faible que l'A.I.A. Cette inhibition est annulée, exception faite pour l'acide pyruvique, par l'apport des différents « métabolites antiauxines » déjà utilisés sur l'organisme test. A ce sujet, il faut surtout retenir que, dans nos conditions expérimentales, l'antagonisme acides organiques-arsénite de Na est de type non compétitif.

DISCUSSION et CONCLUSIONS

DISCUSSION

L'ensemble de l'expérimentation entreprise permet d'apporter quelques éléments nouveaux à la connaissance des deux principaux problèmes abordés au cours de ce travail :

— interactions d'organismes vivant côte à côte sur un même substratum contenant de l'A.I.A. exogène.

— mode d'action de doses inhibitrices d'auxine sur la croissance de micro-organismes.

I. — PROBLEME DES INTERACTIONS

Les données recueillies amènent, en premier lieu, à différencier sur des points précis concernant leur métabolisme les organismes résistants aux fortes doses d'A.I.A. des organismes qui ne le sont pas.

Les deux *champignons résistants,* R. nigricans *et* F. vasinfectum ont en commun un métabolisme caractérisé par une grande production d'acides organiques en particulier di- et tricarboxyliques, qui ne subit aucune modification en présence de doses élevées d'A.I.A. exogène. De plus, ils synthétisent des quantités importantes de diverses substances oligodynamiques à activité antiauxinique : biotine et corps X pour *R. nigricans,* facteurs se comportant comme des composés indoliques chez *F. vasinfectum.* Cependant, les deux champignons diffèrent par leur capacité de destruction de l'A.I.A. exogène qui s'avère nulle pour *R. nigricans* alors qu'elle est très appréciable dans le cas de *F. vasinfectum.*

Chez *l'organisme sensible* à l'A.I.A., *N. galligena,* la formation d'acides organiques di- et tricarboxyliques est plus faible que chez les organismes résistants. Lorsque l'A.I.A. exogène bloque la croissance, il en fait de même pour la production des acides en question. La levée de cette inhibition de croissance par différents métabolites, est concomitante d'une production d'acides organiques égale environ à celle de l'organisme poussant sur milieu témoin..

Au cours de *l'interaction* R. nigricans — N. galligena sur milieu renfermant de l'auxine, on ne constate pas non plus la destruction de l'A.I.A. par *R. nigricans.* En fait, *R. nigricans* sécrète des substances qui rendent *N. galligena* résistant à des doses élevées d'auxine. Cette résistance ne peut être attribuée à une activation

des capacités de destruction enzymatique de l'auxine exogène après pénétration des substances de *R. nigricans* dans les cellules de *N. galligena;* la destruction de l'A.I.A. est en effet négligeable dans nos essais. Enfin, le fait que l'A.I.A. reste pratiquement non modifié dans le milieu de culture des champignons, fait écarter l'hypothèse que la résistance constatée au cours de l'interaction serait due à une neutralisation de l'A.I.A. sous forme de produits de « détoxication », tel que l'acide indoleacetylaspartique mis en évidence par Andreae et Good (1955) et Andreae (1964).

Tout se passe comme si l'excès d'auxine déterminait chez le test N. galligena *une hétérotrophie réversible, notamment en biotine et en acides organiques liés aux processus respiratoires.* R. nigricans *supprime cette hétérotrophie provoquée de* N. galligena *en satisfaisant en particulier les besoins en biotine.*

L'ensemble des données recueillies au cours de cette interaction met particulièrement en relief le rôle joué par les « métabolites antiauxines » dans la plus ou moins grande résistance des microorganismes aux doses élevées d'auxine. Une sensibilité à l'auxine exogène pourrait donc être liée à une hétérotrophie en « métabolites antiauxines ». L'apport de ces derniers confèrerait alors une résistance « acquise » à l'organisme sensible.

La seconde *interaction* F. vasinfectum — N. galligena, sur milieu contenant de l'A.I.A. apporte d'autres éléments. La synthèse de fortes quantités de « métabolites antiauxines » s'allie chez *F. vasinfectum* à un pouvoir certain de destruction de l'auxine. Malgré cela, la levée d'inhibition auxinique chez *N. galligena* ne se produit que faiblement et de façon tardive lorsqu'on cultive côte à côte les deux champignons sur milieu gélosé. Une telle faiblesse d'interaction paraît liée, *au moins en partie, à une faible migration à travers le substratum des substances antiauxiniques sécrétées par* Fusarium. En outre, on ne peut ici pour expliquer aussi la faiblesse d'interaction, invoquer le rôle possible du système enzymatique détruisant l'A.I.A. chez *F. vasinfectum* qui paraît différent de la laccase de *Polyporus* (Fahraeus, 1961) qui elle, diffuse dans la gélose. Enfin, l'action de substances inhibitrices trouvées dans les filaments et le milieu de *F. vasinfectum* pourrait peut-être, sous certaines conditions, interférer avec l'action des « métabolites antiauxines » et masquer leur activité. Et, suivant les conditions expérimentales, l'intervention de ces divers facteurs permet ou non à l'interaction de se manifester.

Nous avons vu dans le cas de l'interaction *R. nigricans-N. galligena* que l'activité d'une dose donnée d'auxine exogène pourrait être principalement fonction de l'équilibre qui s'établit entre cette dernière et les « métabolites antiauxines ». Mais il va de soi que le système « métabolites antiauxines » puisse être associé dans certains cas à un pouvoir de destruction de l'auxine. Chez des champignons tels que *Omphalia flavida* (Ray et Thimann, 1956), *Polyporus versicolor* (Tonhazy et Pelczar, 1954; Fahraeus, 1961), *Melampsora lini* (Oaks et Shaw, 1960) un pouvoir élevé de destruction enzymatique de l'A.I.A. a été trouvé. Enfin, il ne faut pas

perdre de vue que l'action des inhibiteurs de croissance, dont l'importance a été si bien mise en évidence, notamment par Hemberg (1949), Hemberg et Larsson (1961), Libbert (1954, 1961 et 1964), Champagnat (1959 et 1961) et qui ont été décelés aussi dans mes expériences chez *F. vasinfectum* peut également interférer avec l'action de l'auxine. Les problèmes soulevés par l'action de l'auxine exogène sur les micro-organismes montrent alors de façon particulièrement nette combien les auxines sont « un outil qui n'agit jamais seul et dont l'action est inséparable de celle des autres agents tels que les métabolites usuels, les inhibiteurs, les enzymes, les facteurs physiques de structure cytoplasmique, qui varie dans chaque cas, dans chaque circonstance » (Chouard, 1948-1949).

Les différences de réactions, de *N. galligena* inhibé par l'A.I.A. et poussant côte à côte avec *R. nigricans* ou *F. vasinfectum*, m'ont alors amenée à classer les interactions que j'étudie, en « *apparentes* » et « *non apparentes* ».

L'interaction de deux organismes inégalement résistants à l'A.I.A. exogène sera *apparente*, sur un substratum contenant cette auxine mais favorable en tous autres points à la croissance des deux organismes, si rien n'empêche, soit la destruction de l'A.I.A. exogène par l'organisme résistant, soit l'action des « métabolites antiauxines » sécrétés par ce dernier.

L'interaction sera au contraire, *non apparente*, si toutes les conditions de synthèse étant par ailleurs réunies chez l'organisme résistant, un ou plusieurs facteurs secondaires empêchent dans certains cas cet organisme d'agir avec l'autre : non diffusion de l'auxine-oxydase, synthèse concomitante d'inhibiteurs et de « métabolites antiauxines » ou encore si la nature colloïdale du milieu s'oppose entre autres à la migration des substances antiauxiniques synthétisées par l'organisme résistant.

Il faut noter à ce sujet, que dans mes essais, l'auxine ajoutée au milieu de base, est capable de former en l'absence de tout organisme, un composé plus ou moins stable avec les acides malique et surtout citrique. Cette formation augmente en milieu gélosé et si celui-ci est ensemencé avec *N. galligena*. Enfin, il faut tenir compte que la présence des mêmes acides organiques dans le substratum gêne la migration de l'A.I.A. dans l'éther. De tels faits ne compliquent pas seulement l'étude des causes des interactions de croissance observées, mais posent aussi des problèmes de dosage de l'auxine assez délicats. Ils pourraient peut-être, malgré leur caractère préliminaire, faire envisager sous un angle nouveau les rapports A.I.A.-acides organiques à l'intérieur même des cellules.

Par ailleurs, les données recueillies sur *les deux types d'interaction étudiés permettent de mieux comprendre les causes de la persistance ou non d'organismes faisant partie de la microflore du sol lorsque celui-ci est traité par de fortes doses d'herbicides*. Un champignon résistera, par exemple, s'il peut détruire l'auxine comme tout le monde l'admet, mais aussi dans la mesure où il

synthétise suffisamment de « métabolites antiauxines » ou bien encore si, étant sensible à l'action de l'auxine exogène, il peut bénéficier des sécrétions de « métabolites antiauxines » d'organismes vivant à proximité.

Et, nous sommes alors conduits à nous poser, en particulier, le problème de la « résistance provoquée » des organismes naturellement sensibles à l'action des fortes doses d'auxine.

II. — COMMENT *N. GALLIGENA* DEVIENT RESISTANT AUX DOSES D'AUXINE HABITUELLEMENT INHIBITRICES DE SA CROISSANCE

Nous avons déjà mentionné les rapports étroits que l'on peut envisager entre croissance et respiration. Notons seulement, bien que la relation ne soit pas simple, que Thimann (1949; 1956) considère que « la croissance exige au moins une oxydation de l'acide pyruvique conduisant au cycle de Krebs » (1) et « la participation d'un enzyme sulfhydrylé ». Ce dernier point est encore souligné par les essais de Léopold et Guernsey (1953) et de Zenk (1960). On peut supposer que les acides organiques ne participeraient à un grand nombre de réactions qu'après formation de thioesters de CoA; l'un des rôles essentiels de l'auxine dans l'accélération de la croissance pourrait être de catalyser un tel processus.

De plus, les recherches récentes montrent le rôle important que joue la biotine dans les réactions de carboxylation (Wakil, 1958; Wakil et coll., 1962; Waite et coll., 1963; Lynen et coll., 1959; Utter et Keech, 1960; Lane et coll., 1963; Allen et coll., 1963; Himes et coll., 1963; Halenz et coll., 1960; Wood et coll., 1963), où sont impliqués un certain nombre d'acides organiques essentiels.

Dans notre travail, il était alors intéressant d'examiner quels rapports on peut établir entre l'action de substances antiauxiniques connues, actives à faibles doses, comme la biotine ou la citrulline (Nysterakis, 1958) et la formation de quelques acides organiques décelés dans nos préparations. Un tel examen pourrait nous aider à mieux comprendre comment *N. galligena* devient, sous l'action des « métabolites antiauxines », résistant aux fortes doses d'A.I.A.; en outre, cela nous permettrait de réfléchir sur le mode d'action de l'auxine en tant qu'inhibiteur.

Aussi, en premier lieu, *essayons de préciser le lieu d'action de l'auxine au cours de l'inhibition de croissance chez* N. galligena.

1° Tout d'abord, il faut fournir des quantités environ dix fois supérieures d'acides organiques pour lever l'inhibition provoquée par une dose donnée d'A.I.A. chez *N. galligena;* il y a, de plus, compétition. Ces faits sont à rapprocher de l'inhibition de la succino-

(1) Nitsch et Nitsch (1956) à l'aide du test mesocotyle ne trouvent aucun effet appréciable des fumarate, malate, acetate pour augmenter la croissance induite par l'auxine.

déshydrogénase par l'acide malonique étudiée par KREBS et EGGLESTON (1940). Des quantités de succinate, dix à vingt fois supérieures à celles de l'acide malonique, étaient aussi nécessaires pour lever cette inhibition due à l'acide malonique, la réaction étant également compétitive. En outre, un tel renversement pouvait être aussi produit par des doses équivalentes de tous les autres acides du cycle tricarboxylique, malique, oxaloacétique α-cétoglutarique et fumarique. Une telle analogie entre les résultats concernant l'antagonisme A.I.A.-acides organiques et les résultats de KREBS-EGGLESTON, fait supposer que *l'auxine en excès bloquerait des systèmes enzymatiques de réactions clés du métabolisme de* N. galligena.

2° J'ai pu également établir que, sur le milieu de base utilisé dans mes essais, la biotine exogène stimule le plus souvent la synthèse de certains acides organiques du cycle citrique tels que malique, citrique, succinique et fumarique chez N. *galligena*. De plus, la biotine lève sans compétition l'inhibition provoquée par l'A.I.A. et rétablit de manière concomitante la synthèse des acides organiques normalement formés par le champignon. Ces faits nous autorisent à penser que *la biotine est impliquée dans la réaction principale bloquée par l'auxine.*

Aussi, EN DEUXIÈME LIEU, *essayons de localiser la réaction inhibée.* Plusieurs groupes de résultats ont mis en évidence que :

1° On n'observe l'*accumulation d'aucun des acides du cycle citrique, au cours de l'inhibition auxinique de la croissance de* N. galligena. De plus, *tous ces acides lèvent l'inhibition provoquée par l'A.I.A.* Par ailleurs, selon KREBS et LOWENSTEIN (1960), il semble que les différentes étapes du cycle tricarboxylique classique ou du cycle glyoxylique ne sont pas régies par des systèmes enzymatiques où la biotine joue un rôle essentiel. Et cependant, lorsque *la biotine* lève l'inhibition provoquée par l'A.I.A. cette vitamine *active particulièrement la synthèse des acides malique, citrique, fumarique et succinique* et provoque une croissance exubérante du champignon.

Notons, en outre, qu'un inhibiteur de la croissance, spécifique du cycle citrique, a été utilisé sur des épicotyles de pois ou des coléoptiles d'avoine, par THIMANN (1956). L'acide fluoroacétique est métabolisé dans le cycle tricarboxylique jusqu'au stade de l'acide fluorocitrique, qui s'accumule et bloque les oxydations ultérieures. Il est particulièrement intéressant de noter qu'une telle inhibition peut être levée par l'apport d'acide acétique et aussi d'acide pyruvique. En ce qui concerne mes essais, je constate que chez N. galligena, *les acides pyruvique et acétique lèvent l'inhibition de croissance due à l'A.I.A.*

Enfin, la comparaison entre l'action de doses inhibitrices d'A.I.A. et celle d'un autre inhibiteur dont l'activité est connue, nous a donné la possibilité de préciser ensuite quelques points supplémentaires. On sait en effet que l'oxydation de certains acides cétoniques, et principalement du pyruvate, a pu être bloquée par

l'emploi de l'arsénite (Bonner et Thimann, 1950; Thimann, 1956; Hedrick et Sallach, 1960; Roberts, 1964).

Dans mes expériences, *l'arsénite de sodium inhibe la croissance de* N. galligena mais de façon moins importante que l'A.I.A. pour des concentrations équivalentes. *La biotine et les acides malique et citrique, antagonistes de l'auxine, lèvent cette inhibition, mais ici sans compétition. L'acide pyruvique est incapable de lever l'inhibition de croissance de* N. galligena *due à l'arsénite,* alors que ce même acide pyruvique lève l'inhibition due à l'A.I.A.. L'A.I.A. bloquerait donc une réaction différente de celle qu'inhibe l'arsénite, étroitement liée toutefois aussi aux acides organiques des processus respiratoires, mais jouant un rôle bien plus important dans la croissance.

La levée de l'inhibition due à l'A.I.A. par le pyruvate n'est peut être pas une preuve suffisante pour dire que le blocage a lieu avant que le pyruvate soit métabolisé. Ce dernier corps étant au carrefour de plusieurs voies métaboliques, l'organisme pourrait, si besoin est, emprunter un chemin de remplacement pour éviter celui qui est bloqué. On peut seulement supposer que le blocage de l'A.I.A. n'a pas lieu principalement au niveau de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique. Les données recueillies par Berducou et coll. (1962) concernant l'action de la biotine sur la respiration de *N. galligena* font penser à une telle possibilité.

2° *La synthèse des acides aminés et amides étudiés reste fonctionnelle chez* N. galligena *inhibé par l'auxine;* le champignon continue de former notamment les acides aspartique et glutamique, l'alanine et la sérine. Or les chaînes carbonées de ces acides aminés proviennent normalement des acides oxalo-acétique, α-cétoglutarique, pyruvique et acétique (Umbarger et Davis, 1962). Ces acides cétoniques pourraient se former chez *N. galligena* en quantités infimes, non décelables avec notre manière d'opérer, mais suffisantes quand même pour réaliser la synthèse de plusieurs acides aminés importants.

3° Enfin, en ce qui concerne *la citrulline,* j'ai constaté que ce corps ainsi que *l'ornithine et l'arginine,* éléments principaux du cycle de l'urée, *font partie du métabolisme normal de* N. galligena. Rappelons à ce sujet que le champignon possède une uréase (Berducou, 1957). J'ai montré, de mon côté, que *N. galligena* synthétise toujours de l'acide aspartique lorsque sa croissance est inhibée par des doses élevées d'A.I.A.

La citrulline exogène provoquerait alors la levée de l'inhibition en permettant la formation d'acide fumarique à partir de l'acide aspartique par une réaction de transammoniation. Sa régénération par le cycle de l'urée lui ferait jouer un rôle de catalyseur qui expliquerait son action autiauxinique à des doses relativement faibles. Ceci reviendrait, en somme, à lever l'inhibition par de l'acide fumarique synthétisé par une voie de remplacement.

Il résulte donc de ces faits que *N. galligena* devient résistant, aux fortes doses d'A.I.A. si on lui fournit à l'état préformé :

— la biotine, active à très faibles doses et qui stimule alors la formation des acides tricarboxyliques, ou bien ces acides eux-mêmes et d'autres en quantités importantes cette fois;

— la citrulline qui semblerait agir par l'intermédiaire de l'acide fumarique.

Ces « métabolites antiauxines » confèrent alors à *N. galligena* une résistance vis-à-vis de l'auxine, qu'il est naturellement incapable d'avoir. Ils permettent ainsi une reprise normale des chaînes de réactions, un moment interrompues.

L'ensemble de toutes ces expériences chez *N. galligena* nous permet de déduire aussi que :

— l'une des réactions inhibées par l'auxine, comprenant un enzyme qui exige la présence de biotine, serait étroitement liée au cycle citrique sans toutefois en faire partie;

— l'A.I.A. exogène en excès a pu bloquer une ou plusieurs voies conduisant directement ou indirectement au cycle citrique.

En considérant le mode d'action supposé de la biotine ou de la citrulline dans la levée de l'inhibition provoquée par l'A.I.A. et les implications possibles des acides organiques, il ne faut pas perdre de vue que chez le même test *N. galligena,* plusieurs autres substances sont capables de lever l'inhibition auxinique. Le corps X synthétisé par *R. nigricans* et les facteurs *Fusarium* présents dans les filaments et le milieu de culture de *F. vasinfectum* sont, comme la biotine, actifs à très faibles doses et sans compétition. D'autre part, Nysterakis (1954) a montré que l'extrait de coton cardé lève compétitivement l'inhibition de croissance de *N. galligena* provoquée par des doses plusieurs fois supérieures d'A.I.A.. Le simple rapport des concentrations des antagonistes indique qu'il ne s'agit pas alors de l'action des acides organiques dont j'ai établi le rôle antiauxinique. Toutes ces diverses substances, peuvent-elles remplacer la biotine dans la réaction bloquée par l'A.I.A., ou encore, jouent-elles un rôle comparable à celui attribué à la biotine dans des réactions voisines qui sont au départ de la synthèse des acides des processus respiratoires. Par ailleurs, on sait que si la glycolyse et le cycle citrique sont à la base des processus respiratoires, ceux-ci dépendent du bon fonctionnement d'une série d'autres réactions : phosphorylation des substrats, régénération du NADH, récupération des accepteurs d'hydrogène etc. Tout ce qui modifie ces réactions aura un effet sur les processus respiratoires et partant, sur la croissance. On peut supposer, tout en considérant que dans mes essais les phénomènes essentiels se situent au niveau de la synthèse de certains acides organiques, que l'accélération d'une de ces réactions, sous l'action du corps X, des facteurs *Fusarium* ou de la biotine, serait peut-être aussi mise en cause pour renverser, au moins *en partie,* l'inhibition auxinique de *N. galligena.*

L'énoncé de ces quelques questions montre que si les données déjà obtenues permettent maintenant de voir plus clair sur le niveau d'action inhibitrice de l'auxine chez les micro-organismes, elles présentent encore plus d'intérêt par l'ouverture sur les problèmes qui restent à résoudre.

Considérons de plus que, même dans l'esprit des auteurs pour lesquels les actions accélératrice et inhibitrice de l'auxine ne sont pas les deux aspects d'une même réaction, il existe certainement des rapports très étroits entre les deux phénomènes. La voie suivie au cours de ce travail pourrait donc aussi nous donner de précieuses indications sur la réaction initiale de l'auxine dans son rôle accélérateur.

CONCLUSIONS

Ce travail a permis de mettre en évidence des *interactions de croissance de champignons inégalement résistants à l'auxine exogène*. Les mécanismes en jeu au cours de ces interactions ont particulièrement retenu mon attention. Les tentatives pour connaître la voie par laquelle l'A.I.A. inhibe la croissance des micro-organismes s'est révélée fructueuse. Les points suivants ont pu être établis.

1° Lorsque *R. nigricans* et *N. galligena*, connus pour être l'un résistant et l'autre inhibé dans sa croissance par l'auxine, sont cultivés côte à côte dans un milieu contenant des doses élevées d'A.I.A., *N. galligena* présente une croissance normale. L'interaction des deux champignons est « apparente ».

— *R. nigricans* ne détruit pas alors l'A.I.A. exogène; il synthétise dans ses filaments et sécrète dans son milieu de culture des substances qui rendent *N. galligena* résistant à l'auxine :

— à partir du milieu de culture de *R. nigricans* ont été isolés des corps à activité antiauxinique, tels que la biotine obtenue à l'état cristallisé au Rg 140-120, et un corps X au Rg 70-95; ces substances lèvent à très faibles doses, et sans compétition, l'inhibition de croissance de *N. galligena*.

2° Lorsque *F. vasinfectum*, champignon résistant à des doses élevées d'auxine exogène, est cultivé sur milieu gélosé riche en A.I.A. en même temps que *N. galligena*, la levée d'inhibition de ce dernier reste faible et tardive. Or, *N. galligena*, poussant sur le filtrat du milieu de culture de *F. vasinfectum*, à qui l'on ajoute ensuite A.I.A. + gélose, a une croissance non inhibée. Le milieu colloïdal ne permet donc pas la migration des substances antiauxiniques de *Fusarium*, et empêche ainsi l'interaction d'être « apparente ». C'est la raison pour laquelle dans ce travail, je la désigne par le terme de « non apparente ».

— *F. vasinfectum* détruit des quantités appréciables d'A.I.A. exogène.

— Il a ensuite été montré que *F. vasinfectum* synthétise et sécrète principalement une substance antiauxinique, probablement à noyau indolique, au $R_{A.I.A.}$ de 25 à 50 (si $Rf_{A.I.A.} = 100$) et une autre ($R_{A.I.A.}$ de 180 à 200), en quantité moins importante, mais qui, toutes deux, à très faibles doses, lèvent sans compétition l'inhibition de croissance de *N. galligena*. J'ai dénommé ces corps, facteurs *Fusarium I et II*.

3° L'apport de biotine, du corps X ou du facteur *Fusarium I* détermine une croissance normale de *N. galligena* en présence de doses élevées d'A.I.A. sans destruction de ce dernier.

Ces mêmes substances lèvent de plus, entièrement, l'inhibition provoquée par l'acide α-naphtyl-acétique. Elles agiraient donc, non pas en activant un système enzymatique de destruction de l'auxine mais plutôt à un niveau du métabolisme du champignon test inhibé, permettant ainsi une reprise d'activité des chaînes de réactions servant à la croissance.

4° Chez les deux organismes résistants, le métabolisme des acides aminés et des acides organiques ne subit pas de changement notable en présence de fortes doses d'A.I.A.. Par contre, chez N. galligena, *l'A.I.A. bloque la formation des acides organiques alors que le métabolisme des acides aminés et amides n'est pas perturbé.* L'apport de biotine, du corps X, ou du facteur *Fusarium I* restaure les synthèses bloquées et lève l'inhibition de croissance.

5° La biotine exogène qui, chez *N. galligena,* annule l'inhibition de croissance et rétablit la formation de nombreux acides organiques et, en milieu témoin, stimule le plus souvent la synthèse de certains d'entre eux, doit être impliquée dans la réaction principale bloquée par l'auxine.

6° Les acides, dont la formation est bloquée par une trop forte concentration (3.10^{-4} M/l) d'A.I.A., (soit malique, citrique, glycolique, fumarique et succinique) fournis à des doses équivalentes aux quantités synthétisées par les champignons résistants, sont inactifs pour lever l'inhibition de croissance due à cette auxine. Ces mêmes acides et d'autres, qui leur sont étroitement liés tels que les acides α-cétoglutarique, pyruvique et acétique, fournis à des doses supérieures à celles trouvées dans le milieu et les filaments des champignons résistants et dix fois supérieures aux concentrations d'A.I.A. exogène, suppriment tout ou partie de l'inhibition auxinique chez *N. galligena;* les acides succinique, fumarique et acétique se montrent les moins actifs. Dans tous ces cas, le rapport métabolite/antimétabolite est le plus souvent de type compétitif.

7° Dans cette étude, j'ai été amenée également à faire quelques remarques concernant l'action de certains acides organiques sur l'extraction et le dosage de l'A.I.A. :

a) Ce travail a donné lieu à une observation qui mériterait une étude spéciale. Il s'agit de la formation d'un ou plusieurs composés indoliques à partir de l'A.I.A. introduit dans le milieu de base en présence des acides malique et surtout citrique. La quantité du ou des composés en question augmente dans le milieu lorsque la gélose est ajoutée. Ce phénomène s'accentue chaque fois que dans un tel substratum le test *N. galligena* est ensemencé.

b) Au cours des extractions par l'éther en milieu gélosé, la présence des acides malique ou citrique diminue considérablement aussi la migration de l'A.I.A. dans l'éther. Cette diminution n'est

pas due à la formation du composé indolique précité. Il en résulte que des variations normales ou accidentelles de l'un des deux acides organiques en question ou d'autres, peuvent influencer la quantité d'auxine extractible et par là, conduire à des interprétations physiologiques qui s'écarteraient de la réalité.

8° Pour mieux saisir le mode d'action de l'auxine, je l'ai comparé sur le test *N. galligena* à celui d'un autre inhibiteur, l'arsénite de sodium. Celui-ci, à doses égales, produit une inhibition moins importante, qui est levée sans compétition par la biotine et également sans compétition par la plupart des acides organiques déjà démontrés pour lever, au contraire, avec compétition, l'inhibition auxinique. Il n'en est pas de même pour l'acide pyruvique actif dans le cas de l'inhibiteur A.I.A., mais non dans celui de l'arsénite.

***En définitive*, il a été démontré que l'interaction d'organismes, inégalement résistants à l'auxine exogène, se produit dans la mesure où l'organisme résistant peut compenser l'hétérotrophie provoquée par l'auxine en excès chez l'organisme sensible. Cette hétérotrophie est due à une déficience en substances oligodynamiques du type biotine, aussi bien qu'en d'autres, foncièrement différentes de celle-ci.**

D'autre part, l'action inhibitrice *principale* de l'auxine sur la croissance de champignons se situerait au niveau de la synthèse de certains acides organiques placés au carrefour des processus de respiration et de croissance.

BIBLIOGRAPHIE

Aberg (B.). — On auxin antagonists and synergists in root growth. — *Physiol. Plant.*, **3** (1950), p. 447.

— On the growth substance activity of enantiomorphic α(naphtoxy-) propionic acids. — *Archiv für Kemi*, **3** (1951), p. 549.

— On optically active growth regulators. — *Ann. Agr. Coll. Sweden*, **20** (1954), p. 241.

— Auxin relations in roots. — *Ann. Rev. Plant Physiology U.S.A.*, **8** (1957), 153-180.

Allen (S. H. G.), Stjernholm (R.), Wood (H. G.). — The noninvolvement of the ureido carbon of biotin in transcarboxylation. — *J. biol. Chem. U.S.A.*, **238** (1963), PC 2889-2892.

Andreae (W.A.). — Auxin metabolism and root growth inhibition. — V° *Colloque Intern. du C.N.R.S. sur les substances de croissance végétales Gif-sur-Yvette* (1964), p. 559-573.

Andreae (W. A.) et Good (N. E.). — The formation of indole acetyl aspartic acid in pea seedlings. — *Plant Physiol.*, **30** (1955), p. 380-382.

Bach (D.). — La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation des sels ammoniacaux. — *C. R. Ac. Sci. Paris*, **184** (1927_a), p. 766-768.

— La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation de l'ion nitrique. — *C. R. Ac. Sci. Paris*, **184** (1927_b), p. 1578-1579.

Baldridge (R. C.), Tourtelotte (C. D.). — The metabolism of histidine. I. Effects of vitamin B6 and or biotin deficiency. — *J. Biol. Chem.*, **227** (1957), p. 441-448.

Barron (E. S. G.) et Ghiretti (F.). — The pathways of acetate oxidation. — *Biochim. et Biophys. Acta*, **12** (1953), p. 239-249.

Behrens (M.) et Fischer (A.). — Zerlegung von Stoffgemischen und Identifizierung von chemischen Substanzen durch Verdamfen und Kondensieren in einem Wärmegradieten. — *Naturwissenschaften*, **41** (1954), p. 13.

Bennet-Clark (T. A.), Tambiah (M. S.), Kefford (N. P.). — Estimation of plant growth substances by partition chromatography. — *Nature*, **169** (1952), p. 452.

Bentley (J. A.). — Auxins and inhibitors. — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9** (1958), p. 47-80.

Berducou (J.). — Différence de sensibilité de *Nectria galligena* et de *Nectria cinnabarina* à l'action de l'acide indol-β-acétique. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **231** (1950), p. 367-369.

— Mécanisme de la formation des chancres à *Nectria* du pommier. Rôle de l'acide indol-β-acétique dans la biologie de *Nectria galligena* Bres. et de *Nectria cinnabarina* Tode. — *Thèse Sciences, Toulouse*, 1957.

— Le cuivre, agent indirect d'inactivation de l'auxine dans le métabolisme de *Nectria galligena*. — *C. R. Ac. Paris*, **247** (1958), p. 344-346.

Berducou (J.), Phipps (J.), Mache (R.). — Action de la biotine sur la respiration de *Nectria galligena* Bres. — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **255** (1962), p. 2164-2166.

Bernhauer (K.), Thole (H.). — Uber die Saürebildung durch Rhizopenarten. I. Die Bildung von Apfelsaüre bei der Fumarsaüregarung. — *Biochem. Z. Dtsch.,* **287** (1936), p. 167-171.

Berry (H. K.), Sutton (H. E.), Cain (L.), Berry (J. S.). — Development of paper chromatography for use in the study of metabolic patterns. — *Univers. Texas Bull.,* **5 109** (1951), p. 22.

Bonner (J.). — Biochemical mechanisms in the respiration of the *Avena* coleoptile. — *Arch. Biochm.,* **17** (1948), p. 311-326.

Bonner (J.), Thimann (K. V.). — « Etudes sur la croissance et l'inhibition de parties isolées de la plante. III. L'action de quelques inhibiteurs intéressés par le métabolisme du pyruvate ». — *Am. J. Bot.,* **37** (1950), p. 66-75.

Bouillenne (R.), Bouillenne-Walrand (M.). — De l'influence des hormones végétales de synthèse sur la croissance de *Fusarium vasinfectum.* — *Acad. roy. Belgique. Bull. Class. Sci.,* XXXVII (1951), p. 557-566.

Briggs (W. R.), Ray (P. M.). — An auxin inactivation system involving tyrosinase. — *Plant Physiol.,* **31** (1956), p. 165.

Broquist (H. P.), Snell (E. E.). — Biotin and bacterial growth. I. Relation to aspartate, oleate, and carbon dioxide. — *J. Biol. Chem.,* **188** (1951), p. 431-444.

Brunel (A.). — Traité pratique de chimie végétale. — *G. Frère Ed., Tourcoing,* **1** (1948).

Brunel-Capelle (G.). — Sur l'importance des composés à fonction thiol dans le métabolisme des végétaux supérieurs. — *Bull. Soc. Fr. Physiol. vég.,* **2** (1956), 3, p. 91-109.

Burström (H.). — Evaluation of the growth activity of naphtalene derivatives. — *Physiol. Plant. Danem.,* **8** (1955), 1, p. 174-188.

Carles (J.), Schneider (A.), Lacoste (A. M.). — Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. — *Bull. Soc. Chim. Biol. Fr.,* **40** (1958), p. 221-232.

Cayley (D. M.). — Some observations on the life of *Nectria galligena* Bres. — *Ann. Bot. London,* **35** (1921), p. 79.

Chambers (E. H.), Delwiche (E. A.) — Biotin and succinate decarboxylation. — *J. Bacteriol,* **68** (1954), p. 131-132.

Champagnat (P.). — Inhibitions et stimulations dans les corrélations entre bourgeons. — *Bull. Soc. Fr. Phys. vég.,* **5** (1959), p. 9 (95-107).

— Dominance apicale, tropismes, épinastie. — *Handbuch Pflanzenphys. Springer-Verlag, Berlin, Gottingen, Heildelberg* (1961), p. 872-908.

Chouard (P.). — Les progrès récents dans la connaissance des substances de croissance. — *Rev. Bot. appl. et d'Agr. Trop.,* **307-320** (1948 et 1949).

Christiansen (G.S.), Thimann (K.V.). — The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. I. Carbo-hydrates. — *Arch. Biochem. Biophys.,* **26** (1950), p. 230-247 et 248-259.

— The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. III. Nitrogen metabolism. — *Arch. Biochem. Biophys.,* **28** (1950), p. 117.

Crowdy (S. N.). — A progress report on the effect of certain organic acids on the growth of *Nectria galligena*. — *Ann. Rept. Agr. Hort. Research Sta. Long Ashton. Bristol* (1947), p. 158-163.

Von Denffer (D.), Behrens (M.), Fischer (A.). — Papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten aus Pflanzen extrakten. — *Naturwiss.*, **39** (1952), p. 258.

Dhillon (A. S.), Lucas (E. H.). — Absorption, translocation and persistence of 2,4-D in plants. — *Bot. Gaz.*, **112** (1950), p. 198-207.

Eames (A. J.). — Destruction of phloem in young bean plants after treatment with 2,4-D. — *Am. J. Bot.*, **37** (1950), p. 840.

Von Euler (H.), Philipson (T.). — Wasserlösliche Wachstumsfaktoren. — *Biochem. Zeitschr.*, **245** (1932), p. 418.

Fähraeus (G.). — Production of high laccase yields in cultures of fungi. — *Physiol. Plant. Danem.*, **11** (1958), 3, p. 631-643.

— Oxidation of indole-3-acetic acid by fungal laccase. — *Physiol. Plant. Danem.*, **14** (1961), p. 171-176.

Fähraeus (G.), Tullander (V.). — Effect of indole-3-acetic acid on the formation of oxidases in fungi. — *Physiol. Plant. Danem.*, **2** (1956), 3, p. 494-501.

Fleming (A.). — On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. — *The Bristish J. of Experim. Pathology*, v. **10** (1959), p. 226-236.

Foster (J. W.), Waksmann (S. A.). — The specific effect of zinc and other heavy metals on growth and fumaric acid production by *Rhizopus*. — *J. Bact.*, XXXVII (1939_a), p. 599-617.

Foster (J. W.), Waksmann (S. A.). — The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **61** (1939_b), p. 127-135.

Foster (J. W.), Carson (S. F.), Anthony (D. S.), David (J. B.), Jefferson (W. E), Long (M. V.). — Aerobic formation of fumaric acid in the mold *Rhizopus nigricans* : synthesis by direct C_2 condensation. — *Proc. Nat. Ac. Sc. U.S.A.*, **35** (1949), p. 663-672.

Foster (J. W.), Carson (S. F.), Rubens (S.) and Kamen (M. D.). — « Carbone radioactif comme indicateur de l'utilisation du carbone dioxide. VII. L'assimilation du carbone dioxide par les moisissures ». — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, XXVII (1941), p. 590-596.

Foster (J. W.), Davis (J. B.). — Anaerobic formation of fumaric acid by the mold *Rhizopus nigricans*. — *J. of. Bact.*, **56** (1948), p. 329-338.

Galston (A. W.), Bonner (J.), Baker (R. S.). — Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system in peas. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **49** (1953), p. 456-470.

Goas (M.). — Contribution à la physiologie des composés thiols chez les végétaux. Etude comparée de leur métabolisme chez les Liliacées. Leur localisation et leur importance dans les organes en croissance. — *Thèse Sciences, Toulouse*, 1959.

Gordon (S. A.), Weber (R. P.). — Colorimetric estimation of indoleacetic acid. — *Plant. Physiol.*, **26** (1951), p. 192-195.

Gothoskar (S. S.), Sreenivasan (A.). — Biotin metabolism in microorganisms. Part I. Biosynthesis. Part II. Role of biotin in some oxidative systems. Part. III. Aspartic acid oxidation and deamination. — *Ind. Jour. Med. Res.*, **41** (1953), p. 51-84.

Gruen (H. E.). — Auxins and fungi. — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **10** (1959), p. 405-440.

Halenz (D. R.), Lane (M. D.). — Properties and purification of mitochondrial propionyl carboxylase. — *J. Biol. Chem.*, **235** (1960), p. 878-884.

Hansen (B.). — A physiological classification of « shoot auxins » and « root auxins » I. II. — *Botan. Notiser*, **230** (1954), p. 318.

Hasman (M.), Bara (M.). — Investigations on auxin-gibberellin interaction on the growth mechanism of *Helianthus annuus* seedlings. — *Experientia*, **17** (1961), p. 400-401.

Hedrick (J. L.), Sallach (H. J.). — Metabolism of hydroxypyruvate. — *Feder. Proc.*, **19** (1960), p. 36.

Hemberg (T.). — Growth inhibiting substances in terminal buds of *Fraxinus*. — *Physiol. Plant. Danem.*, vol. **1** (1949), p. 37-44.

Hemberg (T.), Larsson (I.). — The inhibitor α-complex from resting potato tubers as an inhibitor of α-amylase. — *Physiol. Plant. Danem.*, vol. **14** (1961), 861-867.

Himes (R. H.), Young (D. L.), Ringelmann (E.), Lynen (F.). — The biochemical function of biotin. V. Further studies on β methyl crotonyl CoA carboxylase. — *Biochem. Z. Dtsch.*, **337** (1963), 1, p. 48-61.

Hirata (S.). — Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. 4. Production of auxin by the fungi *Fusarium* sp. and growth promotion of rice seedlings by their culture filtrates. — *Bull. Fac. Agric. Univ. Miyasaki*, **3** (1958), 1-2, p. 46-52.

Irwine (V. C.). — Studies in growth promoting properties as related to x-radiation and photoperiodism. — *Univ. Colo. Studies.*, **26** (1938), p. 69.

Jefferson (W. E.), Foster (J. W.). — Tracer studies of formate metabolism in fungi. — *J. Bacter.*, **65** (1953), p. 587-592.

Jefferson (W. E.), Foster (J. W.), Phares (E. F.), Carson (S. F.). — Formate as a precursor of carboxylic acid in fungi. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** (1952), p. 1477-1478.

Jerchel (D.), Müller (R.). — Papier chromatographie der β-Indolylessigsaüre. — *Naturwiss.*, **38** (1951), p. 561.

Jerebzoff-Quintin (S.). — Au sujet de l'interaction de deux organismes, dont l'un est soumis à des doses inhibitrices d'auxine. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **243** (1956), p. 2122-2124.

— Au sujet d'un nouveau corps antagoniste de l'action inhibitrice de l'auxine. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **246** (1958), p. 1260-1263).

— Blocage de la synthèse de quelques acides organiques chez *Nectria galligena* soumis à des doses inhibitrices d'auxine. Reprise des processus par action de la biotine. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **248** (1959_a), p. 727-729.

— Sur le rôle de certains acides organiques comme antagonistes de l'action inhibitrice de l'auxine chez *Nectria galligena*. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **248** (1959_b), p. 1389-1392.

— Croissance de *Rhizopus nigricans* Ehr. et de *Nectria galligena* cultivés avec ou sans auxine, et synthèses de quelques acides organiques et aminés. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **250** (1960_a), p. 1337-1339.

— Présence dans les filaments de *Fusarium vasinfectum* de substances faisant disparaître chez *Nectria galligena* l'inhibition de croissance provoquée par l'auxine. — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **250** (1960_b), p. 1718-1720.

— Interactions apparentes et non apparentes de champignons inégalement résistants à l'auxine exogène. — *Bull. Soc. Fr. Phys. vég.*, t. **6** (1960_c), p. 92-94.

— Localisation de « métabolites antiauxines » contenus dans le filtrat de culture de *Fusarium vasinfectum.* — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **254** (1962), p. 2059-2061.

— Les substances sécrétées par *Rhizopus nigricans* et *Fusarium vasinfectum* annulent l'inhibition de croissance de *Nectria galligena* provoquée par l'acide α-naphtalène acétique. — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **256** (1963), p. 765-767.

— Au sujet de la relation acide indol-β-acétique-acides organiques dans l'inhibition de croissance de *Nectria galligena.* — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **258** (1964_a), p. 1884-1887).

— Evolution dans le temps de l'acide indol-β-acétique au cours de l'inhibition de croissance de *Nectria galligena* et de la levée de cette inhibition. — *C. R. Ac. Sc. Paris,* **258** (1964_b), p. 2656-2659.

Kalyanasundaram (R.), Lakshminarayanan (K.). — Rooting of cut shoots of cotton in culture filtrate of *Fusarium vasinfectum.* — *Nature,* **171** (1953), p. 1120.

Kenten (R. H.). — The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. — *Biochem. J.,* **59** (1955), p. 110-121.

Koepfli (J. B.), Thimann (K. V.), Went (F. W.). — Phytohormones : structure and physiological activity. I. — *J. Biol. Chem.,* **122** (1938), p. 763-780.

Kögl (F.), Fries (N.). — Ueber den Einfluss von Biotin, Aneurin und Mesoinosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. — *H. S. Zeitschr. physiol. Chem.,* **249** (1937), p. 93.

Kögl (F.), Kostermans (D.G.). — Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. — *H. S. Zeitschr. physiol. Chem.,* **228** (1937), p. 113-121..

Kögl (F.), Tönnis (B.). — Uber das Biosproblem. Darstellung von kristallisiertem Biotin aus Eigelb. — *H. S. Zeitschr. physiol. Chem.,* **242** (1936), p. 43.

Kovoor (A.). — Action du lait de noix de coco sur la prolifération des tissus de topinambour cultivés *in vitro.* — V° *Colloque Intern. du C.N.R.S.* « Les substances de croissance végétales », *Gif-sur-Yvette,* 1964, p. 83-96.

Krebs (H. A.), Eggleston (L. V.). — The oxidation of pyruvate in pigeon breast muscle. — *Biochem. J.,* **34** (1940), p. 442.

Krebs (H. A.), Lowenstein (J. M.). — The tricarboxylic acid cycle. — in *Metabolic Pathways,* v. **1** (1960), p. 129-203. *Acad. Press, Greenberg D. M.,* édit.

Lampen (J. O.), Kline (A. A.), Peterson (W. H.). — The determination of biotin by a microbiological assay. — *J. Biol. Chem.,* **140** (1941), p. 74.

Landy (M.), Dicken (D. M.). — A microbiological assay method for six B vitamins using *Lactobacillus casei* and a medium of essentially known composition. — *J. Lab. and Clin. Med.,* **27** (1942), p. 1086.

Lane (D.), Halenz (D.R.), Kosow (D.P.), Hegre (S.C.). — Further studies on mitochondrial propionyl carboxylase. — *J. Biol. Chem.,* **235** (1960), p. 3082-3086.

Lane (D.), Lynen (F.). — The biochemical function of biotin. VI. Chemical structure of the carboxylated active site of propionyl carboxylase. — *Proc. Nation. Acad. Sc. U.S.A.*, **49** (1963), 3, p. 379-385.

Lapchine (L.). — Etude de 217 souches de streptocoques d'origine humaine. — *Thèse Médecine, Toulouse*, 1954.

Legrand (G.). — Etude de quelques propriétés d'un système enzymatique oxydant l'acide indol-β-acétique. — *Bull. Soc. Chim. Biol. Fr.*, **39** (1957), p. 1289.

Leopold (A.C.), Guernsey (F.S.). — A theory of auxin action involving coenzyme A. — *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, **39** (1953), p. 1105.

Leopold (A.C.), Plummer (T.H.). — Auxin-phenol complexes. — *Plant Physiol.*, **36** (1961), p. 589-592.

Leopold (A.C.), Price (A.C.). — The influence of growth substances upon sulphydryl compounds. — *Proceed. Symp. at. Wye College.* Ed. Wain et Wightman, Butterworths scientific publications, 1956.

Lewis (R.W.). — Mutants of *Neurospora* requiring succinic acid or a biochemically related acid for growth. — *Am. J. Bot.*, **35** (1948), n° 1, p. 292-295.

Libbert (E.). — Des Zusammenwirken von Wuchs- und Hemmungstoffen bei der korrelativen Knospenhemmung. — *Planta Allem.*, **44** (1954) p. 286-318.

— La dormance des bourgeons et ses relations avec l'inhibition corrélative. — *Bull. Soc. Fr. Physiol. vég.*, **7** (1961), p. 55-73.

— Significance and mechanism of action of natural inhibitors. — *V° Colloque Intern. du C.N.R.S.* « Les substances de croissance végétales », Gif./Yvette, *1964*, p. 387-405.

Lichstein (H.C.). — Functions of biotin in enzyme systems. — *Vitamins and Hormones*, **9** (1951), p. 27-74.

— The presence of bound biotin in purified preparations of oxalacetic carboxylase. — *J. Biol. Chem.*, **212** (1955), p. 217.

— Bound biotin in oxaloacetic carboxylase preparations. — *Arch. Biochem. Biophy.*, **71** (1957), p. 276-277.

Lynen (F.), Knappe (J.), Lorch (E), Jütting (G.), Ringelmann (E.). — Die biochemische Funktion des biotins. — *Angew Chem.*, **71** (1959), p. 481.

Mac Hargue (J.S.), Calfee (R.K.). — Effect of manganese, copper and zinc on growth and metabolism of *Aspergillus flavus* and *Rhizopus nigricans*. — *Bot. Gaz.*, **XCI** (1931), p. 183-193.

Mac Ilrath (W.J.), Ergle (D.R.). — Further evidence of the persistence of the 2, 4-D stimulus in cotton. — *Plant Physiol.*, **28** (1953), p. 693-702.

Morquer (R.), Viala (G.), Rouch (J.), Fayret (J.), Bergé (G.). — Contribution à l'étude morphogénique du genre *Gliocladium*. — *Bull. Soc. Myc. Fr.*, **79** (1963), p. 137-241.

Mudd (J.B.), Mac Manus (T.T.). — Participation of sulfhydryl groups in fatty acid synthesis by chloroplast preparations. — *Plant Physiol.* **39** (1964), p. 115-119.

Muir (R.M.), Hansch (C.). — On the mechanism of action of growth regulators. — *Plant Physiol.*, **28** (1953), p. 218-232.

Müller (W.F.). — Zur Wirkstoffphysiologie des Bodenspilzes *Mucor Ramannianus*. — *Ber. d. schweiz. bot. Ges.*, **51** (1941), p. 165.

Müller (W.F.), Schopfer (W.H.). — L'action de l'aneurine et de ses constituants sur *Mucor Ramannianus* Möll. — *C. R. Ac. Sc. Paris*, **205** (1937), p. 687.

Nadkarni (G.R.), Sreenivasan (A.). — The metabolism of serine in biotin deficiency. — *Proc. Indian Ac. Sc.*, **46 B** (1957), p. 229-235.

Nitsch (J.P.). — Methods for the investigations of natural auxins and inhibitors. In : The chemistry and mode of action of plant growth substances. R.L. Wain and F. Wightman, eds. Butterworths, London, 3-31 (1956).

— L'étude des substances de croissance naturelles des plantes supérieures. — *Bull. Soc. Fr. Physiol. vég.*, **6** (1960), 3, p. 137-146.

Nitsch (J.P.), Nitsch (C.). — The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. — *Beitr. zur Biol. der Pflanzen.*, **31** (1955), p. 387-408.

— Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new sensitive, straight-growth test for auxins. — *Plant Physiol.*, **31** (1956), p. 94-111.

— An artefact in chromatography of indolic auxins. — *Plant Physiol.*, **35** (1960), 4, p. 450-454.

Nysterakis (F.). — Nouvelles recherches sur le mécanisme de l'action inhibitrice exercée par les doses élevées d'auxine. — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **236** (1953_a), p. 2433-2435.

— L'auxine est-elle à la fois, métabolite et antimétabolite ? — 78e *Congrès des Soc. Sav.* (1953_b), p. 219-236.

— Résistance de *Neurospora tetrasperma* aux fortes doses d'auxine et relation avec l'hypothèse de l'existence des « métabolites antiauxines ». — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **238** (1954_a), p. 143-145.

— Considérations nouvelles sur le mécanisme de l'inhibition provoquée par l'auxine. Conséquences possibles dans l'interprétation des corrélations chez les végétaux. — *Rev. Gén. Bot.*, **61** (1954_b), p. 285-299; p. 337-385; p. 416-452.

— L'emploi des microorganismes faciliterait l'étude des causes de l'inégale sensibilité des cellules à l'auxine et de son action inhibitrice. — *VIIIe Congrès International de Botanique, Paris 1954*$_c$, sect. 11 et 12, p. 181-183.

— La sensibilité inégale de *Nectria galligena* et de *Neurospora tetrasperma* aux doses élevées d'acide indol-β-acétique serait due à leur capacité différente de synthétiser des corps antagonistes de l'action inhibitrice de l'auxine. — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **242** (1956_a), p. 1056-1058.

— Remarques sur le mécanisme de l'action inhibitrice de l'auxine. — *Bull. Soc. Fr. Phys. Vég.*, **2** (1956_b), p. 79-82.

— Antagonisme entre auxine et citrulline sur le test *Nectria galligena*. — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **246** (1958), p. 818-820.

— Quelques précisions au sujet de l'interaction entre auxine et métabolites antiauxines. — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **252** (1961), p. 785-787.

Oaks (A.), Shaw (M.). — An indoleacetic acid oxidase system in the mycelium of *Melampsora lini* (Pers Lev.). — *Canad. J. Bot.*, **38** (1960), p. 761-767.

Ochoa (S.). — Biological mechanisms of carboxylation and decarboxylation. — *Physiol. R.*, **31** (1951), p. 56.

Pilet (P.E.). — Dosage photocolorimétrique de l'acide β-indolyl-acétique; application à l'étude des auxines-oxydases. — *Rev. Gén. Bot. Fr.*, **64** (1957), p. 106.

— *Les phytohormones de croissance*, 1961, Paris, Masson édit.

Pilet (P.E.), Kobr (M.). — Gradients biochimiques radiculaires. II. Auxines et respiration. — *Bull. Soc. Bot. Suisse*, **69** (1959), p. 261.

Porter (J.R.), Pelczar (M.J.). — Biotin (Bios II_b, Vitamin H) An essential growth factor for certain staphylococci. — *Science*, **91** (1940), p. 576.

Quintin (S.). — Voir : Jerebzoff-Quintin).

Rasmussen (L.W.). — The physiological action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on dandelion (*Taraxacum officinale*). — *Plant Physiol.*, **22** (1947), p. 377.

Ratner (S.), Anslow (W.P.), Petrack (B.). — Biosynthesis of urea. VI. Enzymatic cleavage of argininosuccinic acid to arginine and fumaric acid. — *J. Biol. Chem.*, **204** (1953), p. 115-126.

Ratner (S.), Petrack (B.). — Conversion of arginino-succinic acid to citrulline coupled to ATP formation. — *Arch. Biochem., Biophys.*, **65** (1956), p. 582-586.

Ray (P.M.). — Destruction of auxin. — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **9** (1958), p. 81-118.

Ray (P.M.), Thimann (K.V.). — Steps in the oxidation of indoleacetic acid. I. Action of an enzyme from *Omphalia flavida*. — *Arch. Biochem. Biophys*,. **64** (1956), p. 175-192.

Rhodes (A.), Templeman (W.G.), Thurston (M.B.). — Effect of the plant growth regulator 4-chloro-2-méthyl-phenoxyacetic acid on mineral and nitrogen contents of plants. — *Ann. of. Bot.*, **14** (1950), p. 181.

Robbins (W.J.), Ma (R.). — Biotin and the growth of *Fusarium avenaceum*. — *Bull. Torrey Bot. Club.*, **68** (1941), p. 446-462.

Roberts (E.H.). — The distribution of oxidation-reduction enzymes and the effects of respiratory inhibitors and oxidising agents on dormancy in rice seed. — *Physiol. Plant. Danem.*, **17** (1964_a), p. 17-29.

— A survey of the effects of chemical treatments on dormancy in rice seed. — *Physiol. Plant. Danem.*, **17** (1964_b), p. 30-43.

Roblin (R.O.). — Metabolite antagonists. — *Chem. Reviews*, **38** (1946), p. 255-377.

— Metabolite antagonists. The relation between chemical structure and biological activity. — *Chem. and Engin. News*, **27** (1949), p. 3624-3629.

Saure (M.). — « Recherches sur les conditions préliminaires pour l'apparition épidémique de *Nectria galligena* ». — *Thèse Berlin*, n° 134 (1961).

Schopfer (W.H.). — Recherches sur le besoin en facteurs de croissance et le pouvoir de synthèse de *Rhizopus suinus*. — *C.R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève*, **59** (1942), n° 2, p. 101.

— Recherches expérimentales sur les facteurs de croissance et le pouvoir de synthèse de *Rhizopus* Cohnii Berl. et de Toni (*Rhizopus suinus* Nielsen). — *Zeitschrift für Vitaminforschung*, **16** (1945), p. 181.

— *Plants and Vitamins, 1949*, Waltham, Mass. U.S.A., Chronica Botanica Coll. Publ.

Sell (H.M.), Luecke (R.W.), Taylor (B.M.), Hamner (C.L.). — Changes in chemical composition of the stems of red kidney bean plants treated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. — *Plant. Physiol.*, **24** (1949), p. 295-299.

Sen (S.P.), Leopold (A.C.). — Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. — *Physiol. Plant. Danem.*, **7** (1954), p. 98-108.

Shull (G.M.), Hutchins (B.L.), Peterson (W.H.). — A microbiological assay for biotin. — *J. Biol. Chem.*, **142** (1942), p. 913.

Skoog (F.), Robinson (B.J.). — A direct relationship between indoleacetic acid effects on growth and reducing sugar in tobacco tissue. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **74** (1950), p. 565-568.

Snell (E.E.), Wright (L.D.). — A microbiological method for determination of nicotinic acid. — *J. Biol. Chem.*, **139** (1941), p. 675.

Stowe (W.W.), Thimann (K.V.). — The paper chromatography of indole compounds and some indole containing auxins of plant tissues. — *Archiv. Biochem. Biophys.*, **51** (1954), p. 499.

Strong (F.M.). — Riboflavin, folic acid and biotin. — *Modern methods of plant analysis*, **IV** 1955, Springer-Verlag, Berlin.

Stutz (R.E.). — The indole-3-acetic acid oxidase of *Lupinus albus* L. — *Plant. Physiol.*, **32** (1957), p. 31-39.

Sund (R.F.), Ravel (J.M.), Shive (W.). — Ornithine-citrulline enzyme synthesis in biotin deficient cells of *Streptococcus lactis*. — *J. Biol. Chem.*, **231** (1958), p. 807-811.

Terroine (T.). — Physiology and Biochemistry of biotin. — *Vitamins and Hormones*, **18** (1960), p. 1-42.

Thimann (K.V.). — Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of growth substance in plant tissues. — *Journ. Gen. Physiol.*, **18** (1934), p. 23-24.

— On the nature of inhibition caused by auxin. — *Am. J. Bot.*, **24** (1937), p. 407-412.

— Plant hormones, growth and respiration. — *Bull. Biol.*, **96** (1949), p. 296-306.

— L'origine et les fonctions des auxines. — *Centre de Document. univer. Paris* (1956_a), p. 1-123.

— Promotion and inhibition : twin themes of physiology. — *Amer. Natur.*, **90** (1956_b), 852, p. 145-62.

Thimann (K.V.), Bonner (W.D.jr). — Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. I. The action of iodoacetate and organic acids on the *Avena* coleoptile. — *Am. J. Bot.*, **35** (1948), p. 271-281.

Tomaczewski (M.). — Chlorogenic acid phenolase as a system inactivating auxin isolated from leaves of some *Prunus* species. — *Bull. Acad. Polon. Sc.*, **VII** (1959), p. 127-130.

Tonhazy (N.E.), Pelczar (M.J.). — Oxidation of indoleacetic acid by an extracellular enzyme from *Polyporus versicolor* and a similar oxidation catalized by nitrite. — *Science*, **120** (1954), p. 141-142.

Umbarger (E.), Davis (B.D.). — Pathways of amino acid biosynthesis. — *The Bacteria*, **III** (1962), p. 168-251, Academic Press, Gunsalus et Stanier ed.

Umrath (K.). — Über Pilzwuchsstoffs mit spezifischer Wirkung. — *Protoplasma*, **33** (1939), p. 13-17.

Utter (M.F.), Keech (D.B.). — Pyruvate carboxylase. — *Feder. Proc.*, **19** (1960), p. 36.

Van Overbeek (J.). — The growth hormone and dwarf type of growth in corn. — *Proc. Nat. Ac. Sc., U.S.A.*, **21** (1935), p. 292-299.

Vigneaud (V. du), Hoffmann (K.), Melville (D.B.). — Isolation of biotin (vitamin H) from liver. — *Jour. Biol. Chem.*, **140** (1941), p. 643.

Vigneaud (V. du), Hoffmann (K.), Melville (D.B.). — On the structure of biotin. — *J. Am. Chem. Soc.*, **64** (1942), n° 1.

Vigneaud (V. du), Hoffmann (K.), Melville (D.B.), Rachele (J.R.). — The preparation of free cristalline biotin. — *J. Biol. Chem.*, **140** (1941), p. 763.

Waite (M.), Wakil (S.J.). — Studies on the mechanism of action of acetyl coenzyme A carboxylase. — *J. Biol. Chem. U.S.A.*, **238** (1963), 1, p. 77-80.

Wakil (S.J.). — A malonic acid derivative as an intermediate in fatty acid synthesis. — *J. Am. Chem. Soc.*, **80** (1958), p. 6465.

Wakil (S.J.), Waite (M.). — On the mechanism of action of enzyme-bound biotin. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9** (1962), p. 18.

Waksman (S.G.), Allen (M.C.). — Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. I. Decomposition of pectin and pectic acid by fungi and the formation of pectolytic enzymes. — *J. Am. Chem. Soc.*, **55** (1933), p. 3408-3418.

Waksman (S.G.), Foster (J.W.). — Effet du zinc sur la végétation de *Rhizopus nigricans* et la production d'acide par cet organisme. — *C.R. Ac. Sc. Paris*, **CCVII** (1938_a), p. 483-486.

— « Respiration et production d'acide lactique par un champignon du genre *Rhizopus* ». — *J. agric. Res.*, **LVII** (1938_b), p. 873-899.

Westergaard (M.), Mitchell (H.K.). — *Neurospora*. V. Synthetic medium for fertility. — *Amer. J. Bot.*, **34** (1947), p. 573-577.

Williams (V.R.), Andrews (E.A.), Christman (J.F.). — Studies on a biotin-hexokinase interrelationship. — *Arch. Bioch. Biophys.*, **66** (1957), p. 234-240.

Wood (H.G.), Allen (S.H.G.), Stjernholm (R.), Jacobson (B.). — Transcarboxylase. III. Purification and properties of methylmalonyl-oxaloacetic transcarboxylase containing tritiated biotin. — *J. Biol. Chem.*, **238** (1963), p. 547.

Wood (H.G.), Lochmüller (H.), Riepertinger (C.), Lynen (F.). — Transcarboxylase. IV. Function of biotin and the structure and properties of carboxylated enzyme. — *Biochem. Z. Dtsch*, **337** (1963), 3, p. 247-266.

Woods (D.D.). — « Relation de l'acide p. aminobenzoïque et du mécanisme de l'action des sulfamides ». — *Brit. J. Exp. pathol.*, **XXI** (1940), 2, p. 74.

Woods (D.D.), Fildes (P.). — « L'activité antisulfanilamide (in vitro) de l'acide p. aminobenzoïque et de ses composés proches ». — *Chemistry and Industry*, **59** (1940), 8, p. 133.

Wright (L.D.), Cresson (E.L.), Driscoll (C.A.). — Biological precursors of biotin and or biotin-L-sulfoxide. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, **89** (1955), p. 234-236.

Wright (L.D.), Skeggs (H.R.). — Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, v. **55** (1944), p. 95-98.

Yamasaki (I.), Souzu (H.). — The mechanism of indoleacetic acid oxidase reaction catalized by turnip peroxidase. — *Arch. Biochem. Biophys.*, **86** (1960), p. 294.

Zenk (M.H.). — Enzymatische Aktivie von auxinen mit ihre Konjugierung mit glycin. — *Zeit F. Naturforsch*, **15** (1960), p. 436.

— l-(Indole-3-acetyl)-β-d-glucose a new compound in the metabolism of indole-3-acetic acid in plants. — *Nature*, **191** (1961), p. 493-494.

Zimmermann (P.W.), Hitchcock (A.E.), Wilcoxon (F.). — Several esters as hormones. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **8** (1936), p. 105-112.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 9

CONDITIONS EXPERIMENTALES ET TECHNIQUES 13

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES INTERACTIONS DE CROISSANCE DE CHAMPIGNONS INEGALEMENT RESISTANTS A L'ACIDE β-INDOLYL-ACETIQUE EXOGENE

CHAP. I. — *Interaction* Rhizopus nigricans - Nectria galligena *en présence d'acide β-indolyl-acétique* 27

I. — DÉVELOPPEMENT DES DEUX ORGANISMES CULTIVÉS ISOLÉMENT SUR LE MILIEU DE BASE ADDITIONNÉ OU NON D'AUXINE EXOGÈNE 27

II. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'INTERACTION EN CULTURES SIMULTANÉES. 36

III. — RECHERCHE DES FACTEURS DE *R. nigricans* 38

A. — Activité du milieu de culture 38

B. — Activité de l'extrait de filaments 42

C. — Essais de détermination de certains corps responsables de la levée d'inhibition chez *N. galligena* 43

CHAP. II. — *Interaction* Fusarium vasinfectum - Nectria galligena *en présence d'acide β-indolyl-acétique* 49

I. — DÉVELOPPEMENT DE *F. vasinfectum* SUR LE MILIEU DE BASE ADDITIONNÉ OU NON D'A.I.A. EXOGÈNE 49

II. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'INTERACTION EN CULTURES SIMULTANÉES. 54

III. — RECHERCHE DES FACTEURS ANTIAUXINIQUES SÉCRÉTÉS PAR *F. vasinfectum* 56

A. — Activité de l'extrait de filaments 56

B. — Activité du milieu de culture de *F. vasinfectum* 58

C. — Essais de détermination des facteurs antiauxiniques de *F. vasinfectum* 62

DEUXIEME PARTIE

COMMENT *NECTRIA GALLIGENA* DEVIENT RESISTANT A L'A.I.A. EXOGENE AU COURS DES INTERACTIONS DE CROISSANCE

CHAP. I. — ***Les substances sécrétées par les champignons résistants rendent-elles* N. galligena *capable de dégrader l'A.I.A. exogène?*** 83

I. — EVOLUTION DE L'A.I.A. EXOGÈNE AU COURS DE LA LEVÉE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *N. galligena* PAR LES FACTEURS SÉCRÉTÉS PAR *F. vasinfectum* ET *R. nigricans* 83

II. — ACTION SUR LA CROISSANCE DE *N. galligena* DE L'ACIDE α-NAPHTYL ACÉTIQUE SEUL OU EN PRÉSENCE DES SUBSTANCES ANTIAUXINIQUES DE *R. nigricans* OU DE *F. vasinfectum* 88

CHAP. II. — ***Etude comparée des métabolismes de* N. galligena, R. nigricans *et* F. vasinfectum *en présence ou non de fortes doses d'A.I.A. exogène*** 91

I. — CAS DE *N. galligena* 93

A. — Métabolisme en présence ou non d'A.I.A. exogène 93

B. — Action des substances antiauxiniques sur la formation des acides organiques au cours du rétablissement de la croissance inhibée par l'A.I.A. de *N. galligena* 99

II. — CAS DE *R. nigricans* 101

III. — CAS DE *F. vasinfectum* 105

CHAP. III. — ***Action de différents acides organiques du cycle citrique au cours de la levée d'inhibition de* N. galligena** 111

I. — ROLE ANTIAUXINIQUE DES ACIDES ORGANIQUES DU CYCLE CITRIQUE AU COURS DE LA LEVÉE D'INHIBITION DE *N. galligena* 111

II. — EVOLUTION DANS LE TEMPS DE L'A.I.A. AU COURS DE LA LEVÉE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *N. galligena* PAR LES ACIDES ORGANIQUES 114

III. — CARACTÈRES DE LA LEVÉE D'INHIBITION DE CROISSANCE DE *N. galligena* PROVOQUÉE PAR L'AUXINE SOUS L'ACTION DE CERTAINS ACIDES ORGANIQUES 119

A. — Type d'antagonisme concernant les réactions A.I.A. - acides organiques chez *N. galligena* 119

B. — Action antiauxinique de certains acides organiques des processus respiratoires distincts du cycle citrique. 127

C. — Action comparée de l'arsénite de sodium et de l'A.I.A. sur la croissance de *N. galligena* 128

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION 139

CONCLUSIONS 147

BIBLIOGRAPHIE 151

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

IMPORTANCE PHYSIOLOGIQUE DE LA BIOTINE

VU : Bon à imprimer,
Toulouse, le 16 septembre 1964,
Le Doyen,
E. DURAND

VU et permis d'imprimer,
Toulouse, le 19 septembre 1964,
Le Recteur,
Président du Conseil
de l'Université :
A. LOYEN

Imp. du Sud, 24, rue de Négreneys. — Toulouse
Dépôt légal n. 208. — Octobre 1964